

Trabajo de Fin de Grado

Ingeniería Química

## Diseño de planta piloto para producción de Celulosa Bacteriana

MEMORIA

Autor: María Guinea Nava

Director: Jordi Bou Serra

Convocatoria: Septiembre 2016



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Industrial de Barcelona



## Resumen

El presente trabajo hace referencia al diseño de una planta piloto productiva de 1.350 kilogramos anuales de celulosa por fermentación bacteriana a partir de desperdicios de piña.

Se ha hecho un estudio de las propiedades que tiene la celulosa bacteriana, las múltiples aplicaciones que tiene en diferentes industrias y la vía de obtención biológica a través de la bacteria con mejores resultados de producción, *G. xylinus*. Además, se expone el estado del arte de la producción de celulosa, los medios de cultivos utilizados, los tipos de fermentadores empleados para la fermentación, proceso de obtención y rendimientos que se han conseguido.

Por otro lado, se hace una reflexión del tipo de fermentador que tenga buenos resultados en la producción de celulosa bacteriana y se elige el *airlift* debido a que es un excelente mezclador y por tener un extenso tiempo de contacto gas-líquido. Estas dos propiedades del reactor potencializan la producción de celulosa por fermentación bacteriana y no causan daño a las células.

Posteriormente, se hace un diseño con los elementos necesarios, el dimensionado y materiales necesarios para el funcionamiento mínimo de la instalación así como la determinación de las condiciones óptimas de fermentación. Con ayuda de esto, se elaboró un estudio económico con una estimación de presupuesto para determinar la viabilidad del proyecto en el cual se obtuvo un precio de venta por kilo de celulosa bacteriana de 415 € y un tiempo de retorno de 5,1 años.



# Sumario

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>SUMARIO</b>	<b>3</b>
<b>1. GLOSARIO</b>	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
2.1. Motivación del Estudio .....	5
2.2. Alcance del Estudio .....	5
2.3. Teoría 1: Materiales compuestos .....	5
2.4. Teoría 2: Celulosa Bacteriana .....	9
2.5. Teoría 3: Obtención de Celulosa Bacteriana .....	19
2.6. Teoría 4: Estado del arte .....	30
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>4. MATERIALES</b>	<b>46</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>47</b>
5.1. Descripción del proceso .....	47
5.1.1. Efecto de la química .....	53
5.1.2. Pre-diseño del fermentador .....	55
5.1.3. Selección de condiciones óptimas .....	59
5.2. Plan general de la planta .....	62
5.2.1. Condiciones esenciales de operación .....	62
5.2.2. Materiales .....	62
5.2.3. Dibujo de la planta .....	65
5.2.4. Flujos .....	66
5.2.5. Operaciones básicas .....	67
5.2.6. Rendimientos .....	69
5.3. Sistemas de separación y purificación .....	71
5.4. Plan de seguridad y operaciones .....	72
<b>6. ESTUDIO ECONÓMICO</b>	<b>76</b>
6.1. Caso particular .....	78
6.2. Viabilidad del proyecto .....	83
<b>7. IMPACTO AMBIENTAL</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>87</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>88</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>89</b>

## 1. Glosario

ATP	Adenosín Trifosfato
c-di-GMP	Digonosina monofosfato
CB	Celulosa Bacteriana
CDG	Diguanil ciclasa
CS	Celulosa sintetasa
DSP	Disodio hidrógeno fosfato
<i>G. xylinus</i>	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>
GK	Gluquiniasa
GMP	Guanosín monofosfato
GTP	Guanosín trifosfato
kDa	Kilodalton
LippPP- $\alpha$ -glucosa	Lípido pirofosfato- $\alpha$ -D-glucosa
LMF	Licor de Maíz fermentado
LPP	Lípido pirofosfato fosfohidrolasa
PDEA	Fosfodiesterasa A
PDEB	Fosfodiesterasa B
PET	Tereftalato de polietileno
PMG	Fosfoglucomutasa
PP	Polipropileno
RBC	Reactor de Disco giratorio
RDF	<i>Rotatory Disc Fermentor</i>
UDP	Uridina difosfato
UDP-G	Uridin difosfato glucosa
UDPG PT	Lípido pirofosfato
UGP	Pirofosforilasa uridina difosfoglucosa
UMP	Uridin monofosfato
v/v	Volumen/volumen
vmm	Volumen por minuto





## **2. Introducción**

### **2.1. Motivación del Estudio**

La creación de nuevos materiales es una necesidad para el progreso tecnológico e ingenieril de la sociedad actual. Así mismo, la sociedad exige materiales con excelentes propiedades mecánicas, bajo coste, sostenibles y amigables con el medio ambiente. En la búsqueda de materiales con estas propiedades, se acude a realizar materiales compuestos de cierto origen natural, los cuales combinan una matriz y un refuerzo, así elevan las prestaciones de ambos logrando un material único con características específicas. Uno de los materiales de especial interés para realizar refuerzos es fibra natural, debido a sus propiedades de resistencia, baja densidad, bajo costo y biodegradabilidad. La celulosa bacteriana (CB) es una fibra natural que es excelente materia prima para la fabricación de materiales compuestos que ofrecen propiedades únicas y mejoradas y, al mismo tiempo, es completamente biodegradable, renovable y sostenible. Por último, la CB es un sustituto de la celulosa vegetal, la cual se obtiene de la tala de árboles, de esta manera, hace del producto de estudio de alto interés por su aportación al problema creciente de la deforestación.

### **2.2. Alcance del Estudio**

Dada la necesidad actual de nuevos materiales y siendo la celulosa bacteriana un material con propiedades únicas, la producción mediante fermentación presenta una alternativa atractiva que se engloba en un nuevo campo de la biorefinerías.

Este trabajo se centrará en el estudio de la viabilidad de producir celulosa mediante bacterias a nivel de una planta piloto teniendo en cuenta todas las operaciones industriales necesarias. Dentro de este estudio, se incluye la recopilación de propiedades físicas y químicas de la celulosa bacteriana; un resumen de la situación actual del mercado y fabricación de la CB; el proceso general de obtención; el diseño de equipos que forman parte del proceso de fabricación a nivel de dimensionado y materiales necesarios; el presupuesto y viabilidad económica; y el impacto ambiental que tiene. Este documento podría ser útil para aquellos que deseen escalar el proceso a un nivel industrial.

### **2.3. Teoría 1: Materiales compuestos**

La mayoría de las tecnologías de hoy en día requiere materiales con una combinación inusual de propiedades, imposible de conseguir con metales, cerámicas o polímeros convencionales. Debido a esta necesidad de combinar las propiedades de los materiales, se ha llegado al desarrollo de materiales compuestos (composites). En términos generales, un material compuesto es un material multifase que conserva una proporción importante de las propiedades de cada fase que lo componen, de manera que presente la mejor combinación posible (1). Las fases constituyentes de estos materiales deben de ser químicamente distintas y separadas por una interfaz logrando una mejora de las propiedades tales como rigidez, tenacidad y resistencia a la tracción a temperatura ambiente y temperaturas elevadas (1).

Los composites están formados por una fase llamada matriz, la cual es continua y rodea a la otra fase, nombrada refuerzo o fase discontinua. La matriz puede ser polimérica, metálica o cerámica, mientras que el refuerzo puede ser particulado, de fibras discontinuas o fibras largas. Debido a que los materiales compuestos poseen una interfase discreta y reconocible que separa ambas fases, son heterogéneos, es decir, sus propiedades no son las mismas en todo su volumen (2). La mayoría de composites son diseñados y fabricados artificialmente, no obstante existen algunos naturales tal como la madera o los huesos (2). Un esquema sencillo para catalogar los materiales compuestos consta de tres grupos: compuestos reforzados con partículas, compuestos reforzados por fibra y compuestos estructurales. En la Figura 1 se observa la clasificación y sub-clasificación de los materiales compuestos (1).

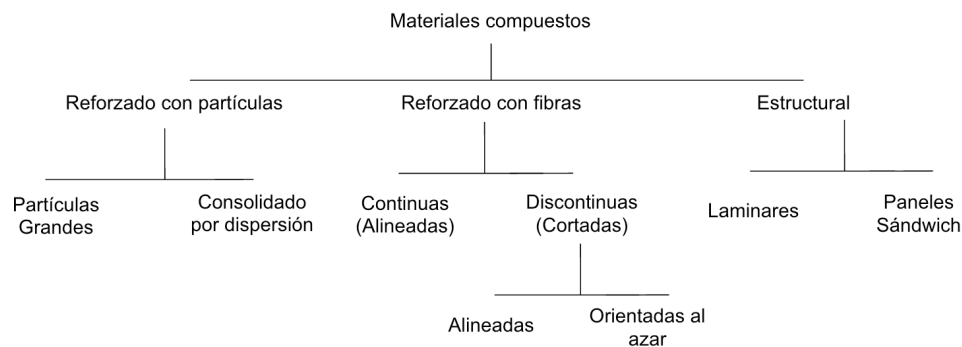


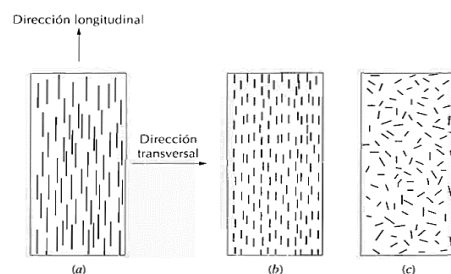
Figura 1: Clasificación de materiales compuestos (1)

Los materiales compuestos reforzados con partículas están caracterizados por contener volúmenes pequeños de sólidos en la fase de refuerzo, los cuales son mucho más duros y resistentes que los de la fase matriz (3). Dentro de este grupo, existen reforzados con partículas grandes las cuales son de un material duro y frágil que se encuentran dispersas uniformemente en una matriz más dúctil y blanda (4). Un ejemplo de material compuesto por partículas grandes es el hormigón, formado por partículas de arena o grava y una matriz de cemento (1). Los materiales compuestos consolidados por dispersión, también forman parte de este grupo, la técnica de dispersión uniforme de partículas finas de material duro e inerte, elevan la resistencia y dureza de metales y aleaciones (1).

Por otra parte, los materiales compuestos estructurales están formados por materiales homogéneos y compuestos, sus propiedades no sólo dependen de los materiales constituyentes sino de la geometría del diseño de los elementos estructurales. Dentro de esta clasificación, puede haber materiales laminares y paneles sándwich, los cuales son los más comunes. La estructura de un material compuesto laminar son paneles que, tienen una dirección preferente con elevada resistencia, mientras que los paneles sándwich tienen dos láminas externas, fuertes y separadas por una capa de material menos denso que tiene baja rigidez y resistencia. (1)



Finalmente, los materiales más importantes, tecnológicamente hablando, son los reforzados por fibras (1). Con frecuencia, éstos se diseñan con el objetivo de conseguir elevada resistencia y rigidez con baja densidad. Los materiales compuestos reforzados con fibra se sub-clasifican por la longitud de su fibra, ya que existe una longitud crítica para aumentar la resistencia y la rigidez del material compuesto, que depende del diámetro de la fibra, la resistencia a la tracción y de la resistencia de la unión matriz-fibra. Las características mecánicas dependen no solo de las propiedades de la fibra, sino también del grado en que una carga aplicada se transmite a la fibra por medio de la fase matriz (1). Así mismo, la disposición u orientación relativa de las fibras y su concentración y distribución, también son factores que influyen en las propiedades del material. Hablando de la orientación, existen dos situaciones, la primera es la alineación paralela a los ejes longitudinales de las fibras y la segunda es una alineación al azar. Las fibras continuas normalmente se alinean, mientras que las fibras discontinuas se pueden alinear u orientar al azar como se observa en la Figura 2 (1). En la Figura 2a se representa fibras continuas alineadas, la Figura 2b discontinuas alineadas y últimamente Figura 2c fibras discontinuas al azar.



*Figura 2: Representación esquemática de compuestos reforzados por fibras*

Una de las ventajas más importantes que tiene el reforzado de fibras, es que las fibras con diámetros pequeños son mucho más resistentes que el material macizo. El objetivo de muchos compuestos reforzados con fibra es elevar la resistencia específica por lo que, los materiales clasificados como fibras, son policristalinos o amorfos, ya que tienen diámetros pequeños. Como consecuencia de su pequeño diámetro, tienen alto grado de perfección cristalina y están casi libres de defectos y, como consecuencia tienen alta resistencia. La aramida, vidrio, carbono, boro y óxido de aluminio son ejemplos de materiales fibrosos. (1)

La fase matriz de un material compuesto con fibras ejerce varias funciones. Primeramente, debe de ser dúctil y por otra parte, el módulo elástico de la fibra debe de ser mucho mayor que el de la matriz. Además, la matriz protege las fibras del deterioro superficial que puede resultar de una abrasión mecánica o reacciones químicas. Finalmente, la matriz separa las fibras e impide la propagación de grietas de una fibra a otra (1). Los polímeros o metales generalmente se utilizan como matriz ya que son materiales muy dúctiles pero los polímeros se utilizan más frecuentemente debido a sus propiedades y a la facilidad de fabricación, sin importar si son termoplásticos o termoestables.

Cabe considerar, por otra parte que las propiedades de los materiales compuestos también dependerán de cómo sea la interfaz entre los dos componentes. La interfaz es la región de contacto de ambas fases y si es débil, la transferencia de carga de la matriz a la fibra no será eficiente y la matriz terminará soportando las cargas o se producirán roturas. Para poder evitar estos problemas, se necesita lograr una buena adhesión que depende del contacto íntimo de los átomos en la superficie de los componentes, lo que provoca que sea una labor difícil. Por

esta razón, existe un gran desarrollo de aditivos con los cuales se recubren las fibras para que tengan una mayor compatibilidad con la matriz y aumenten la adhesión entre las fases (2).

La fibra de vidrio es uno de los materiales compuestos que se produce en grandes cantidades, la cual consiste en fibras continuas o discontinuas de vidrio con una matriz plástica. La facilidad de hilar en fibras de alta resistencia, la fácil obtención, la disponibilidad, su fortaleza como fibra y su estabilidad hacen al vidrio, el material ideal para utilizarlo como refuerzo (1). Este grupo de materiales tiene algunas desventajas y ventajas, a pesar de ser muy resistente no es muy rígido, por lo que no se aplican como miembros estructurales de aviones o puentes. Igualmente, la temperatura de servicio no es muy elevada ya que los polímeros empiezan a fluir y deteriorarse a temperaturas no muy altas (1). Se utilizan diferentes materiales plásticos como matriz de la fibra de vidrio, pero la más común es el poliéster. Las principales aplicaciones de la fibra de vidrio son: tuberías de plástico, recipientes para almacén, sector automotor y navíos.

Otro material compuesto importante es la fibra de carbono, el cual tiene propiedades extraordinarias sin embargo es caro. El amplio uso de este material es debido a su módulo específico mucho mayor al vidrio, su elevada resistencia a la temperatura y a ambientes corrosivos. La fibra de carbono es un material amorfo lo cual hace que ante una tensión de tracción, su resistencia sea muy elevada (2). Los compuestos carbono-carbono también son de alto interés para aplicaciones aeroespaciales de alta temperatura y están formados por fibras de carbono embebidas en una matriz de resina carbonizada (1).

La matriz metálica reforzada con fibras tiene cierto interés, no obstante, su aplicación práctica suele ser limitada. Su interés reside en que su temperatura de servicio es mayor que la de la matriz polimérica y que su resistencia específica alcanza valores elevados debido a su densidad baja. El metal reforzado con fibras más utilizado es el aluminio-boro y las fibras se recubren con una delgada capa de carburo de silicio para evadir reacciones (1).

La mejor combinación de propiedades se logra con los compuestos, relativamente novedosos, denominados híbridos los cuales contienen al menos dos tipos diferentes de fibras en una sola matriz. La combinación que logra mejores propiedades es, fibra de carbono con fibra de vidrio ya que toma las mejores partes de ambos componentes. Esta combinación es más resistente al impacto, más tenaz y económica de fabricar. La principal aplicación que tienen los materiales compuestos híbridos es ser componentes estructurales de baja densidad para la fabricación de transporte aéreo, marítimo y terrestre (1).

Con el objetivo de lograr una fabricación correcta de materiales compuestos existen técnicas desarrolladas tal como la pultrusión, bobinado de filamentos y procesos de producción preimpregnados. La pultrusión es una técnica para fabricar componente de forma alargada y sección constante tal como barras, tubos y vigas. El procedimiento consiste en impregnar de resina termoestable unas mechas de fibras continuas y posteriormente se introducen en un molde-matriz curado que está mecanizado de la forma final deseable. El proceso de bobinado de filamentos radica en circular las fibras por un baño de resina líquida y después se bobinan de modo continuo sobre un mandril mediante un equipo automático. Finalmente, en el proceso de pre-impregnado se obtiene un producto en forma de cinta, las cuales se moldean y se curan



totalmente sin necesidad de añadir ninguna resina (1).

Existe, sin embargo una necesidad de utilizar materiales reforzados con fibras que sean más económicas y de menor impacto ambiental. Para lograr esto, se utilizan polímeros con fibras provenientes de productos naturales como el lino o la fibra de coco. Además, si las fibras de refuerzo son de origen natural, el impacto medioambiental total en la fabricación es mucho menor. Los esfuerzos sobre investigaciones sobre la obtención de materiales verdes o ecológicos están aumentando sustancialmente. En este tipo de materiales, se refuerza la matriz del polímero natural, por ejemplo la celulosa, con fibras de origen vegetal, como es la fibra de lino. Ya existen materiales compuestos totalmente ecológicos y se predice que su producción aumentará en el futuro ya que actualmente, los precios de producción son elevados (2).

## 2.4. Teoría 2: Celulosa Bacteriana

La celulosa es el biopolímero más abundante en la tierra, reconocido como el mayor componente de la biomasa vegetal y constituye el mayor porcentaje de los polímeros de la tierra, siendo inclusive mayor que el de todos los demás juntos (5). Este material ha sido utilizado como materia prima desde hace más de 150 años (6). La celulosa es el principal componente del algodón (cerca del 94%) y madera (más del 50%), ambos constituyen la mayor fuente para productos de celulosa tal como papel, textiles y sus derivados como celofán, rayón y acetato de celulosa (7). No obstante que las plantas sean la mayor fuente de celulosa, algunas bacterias son capaces de producirla como una fuente alternativa.

La celulosa bacteriana pertenece a productos específicos del metabolismo primario y es una capa protectora, mientras que la celulosa originaria de las plantas desempeña un papel estructural (8). Las principales diferencias entre la CB y la celulosa vegetal es que la primera tiene un mayor grado de pureza, ya que no contiene hemicelulosa, lignina y pectina; tiene mayor grado de polimerización; mayor cristalinidad; mayor capacidad de retención de agua y alta estabilidad mecánica y térmica (9). Además de estas características, la estructura compacta ultrafina de la CB hacen de ella producto de alto interés para múltiples aplicaciones en el papel, textil, industria alimentaria y biomateriales de la medicina y cosmética (8).

La mayor producción de celulosa bacteriana es a través de una bacteria gram-negativa llamada *Acetobacter xylinum*, reclasificada como *Gluconacetobacter xylinus* (*G. xylinus*), y ha sido usada como microorganismo modelo para la mayoría de estudios de celulosa bacteriana. El primer estudio reportado de síntesis de una estera gelatinosa extracelular por *G. xylinus* data del 1886 por A.J. Brown y, a partir de la segunda mitad del siglo XX, la CB empezó a generar gran interés científico (8). A.J. Brown definió la celulosa bacteriana como “membrana gelatinosa traslúcida [que crece] en la superficie del medio de cultivo” (9). En la Figura 3 se observa un aumento de patentes que se ha tenido sobre la celulosa bacteriana en los últimos 30 años (10). En 1974, Hestrin et al. comenzaron estudios intensivos en síntesis de CB usando *G. xylinus* y demostraron que células en reposo y liofilizadas de *Gluconacetobacter* sintetizan celulosa en presencia de oxígeno y glucosa. Posteriormente, Colvin en 1975 detectó síntesis de celulosa en muestras libres de células de *G. xylinus*, glucosa y ATP (8).

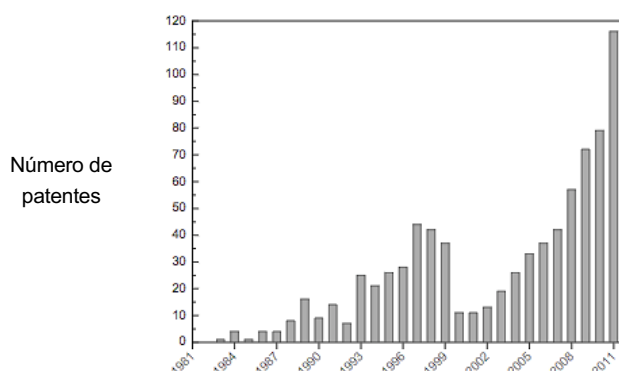


Figura 3: Evolución del número de patentes anual en celulosa bacteriana (10)

La razón por la que la bacteria *G. xylinus* en presencia de oxígeno produce celulosa ha sido motivo de discusión ya que existen tres diferentes teorías. La primera, consiste en que la bacteria produce celulosa para crear una película y así mantener una posición cercana a la superficie de cultivo. La segunda teoría, se basa en que produce celulosa como método de protección a los rayos ultravioleta. Finalmente, la tercera hipótesis asume que las bacterias producen una 'jaula' para protegerse de enemigos y de iones metálicos, mientras los nutrientes se obtienen por difusión (9).

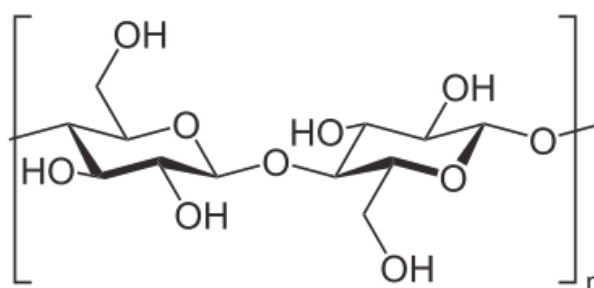


Figura 4: Estructura simple celulosa (61)

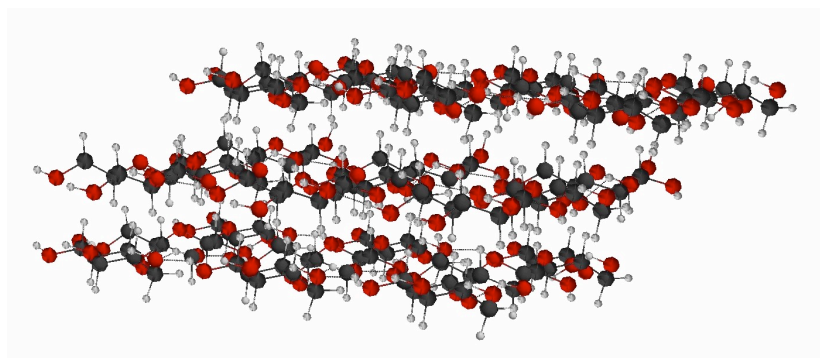


Figura 5: Estructura reticulada celulosa (62)

La estructura de la celulosa consiste en una estructura básica de fibrillas lineal que consiste de 2.000 a 14.000 unidades (5) de la cadena no-ramificada de  $\beta$ -1,4-glucano con la forma molecular  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$  (11) que se observa en la Figura 4. La CB está formada de moléculas de  $\beta$ -glucopiranososa que se unen mediante enlaces covalentes  $\beta$ -1,4-glucosídico, dando como resultado una cadena



polimérica lineal con alto número de grupos hidroxilo situados en posiciones C2, C3 y C6 (9). Las cadenas mencionadas se mantienen unidas por enlaces de inter-hidrógeno e intra-hidrógeno como se observa en la Figura 6 (11). De igual manera, se asocian (cristalizan) por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals y esta asociación de cadenas por cristalización se denomina “microfibrillas” de celulosa (12); posteriormente éstas cristalizan a haces y finalmente en cintas, donde las dimensiones difieren de autor a autor, pero rondan los 3 o 4 nm de grosor y 100 nm de anchura (8). La CB también se distingue por su alto índice de cristalinidad, arriba del 60%, y su grado de polimerización que en algunos casos está entre 2.000 y 6.000, pero en otros llega hasta los 16.000 o 20.000 (8).

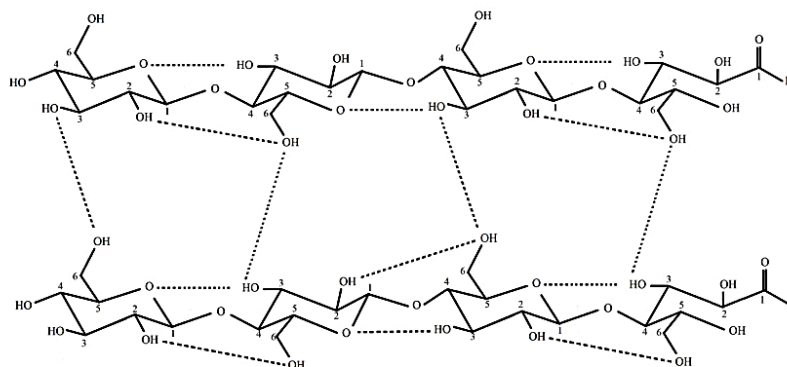


Figura 6: Enlaces inter-hidrógeno e intra-hidrógeno de la celulosa bacteriana (11)

En cuanto a más características de la celulosa bacteriana, es un biopolímero insoluble en agua que posee regiones con alto ordenamiento (cristalinas) y otras que el ordenamiento es bajo (5). Así mismo, presenta varias formas cristalinas, por consecuencia se obtiene un polimorfismo de la celulosa con varias estructuras (I, II, III<sub>I</sub>, III<sub>II</sub>, IV<sub>I</sub> y IV<sub>II</sub>) que pueden ser convertidas unas en otras a través de calor o agentes químicos (5). La celulosa I, encontrada en la naturaleza comúnmente llamada nativa, presenta dos tipos de estructura cristalina I<sub>α</sub> e I<sub>β</sub> y éstas pueden coexistir en diferentes proporciones dependiendo el origen (9). La celulosa I<sub>α</sub> es la que se produce en mayor proporción por bacterias y algas mientras la celulosa I<sub>β</sub> predomina en las plantas (algodón, madera, entre otros). La diferencia principal entre ambas estructuras es el empaquetamiento cristalino, la conformación molecular y los enlaces de hidrógeno (9).

Las formas cristalinas de celulosa, la I y II, son suficientemente distinguibles por rayos X, resonancia nuclear magnética, espectroscopia Raman y análisis infrarrojos. Es conocido que en la forma de celulosa I, la cual es sintetizada por la mayoría de las plantas e incluso *G. xylinus* en cultivo estático, las cadenas paralelas de β-1,4-glucano son ordenadas de forma uniaxial, contrariamente a las cadenas de β-1,4-glucano de celulosa II que son ordenadas en una forma aleatoria (8).

La celulosa II es la estructura más estable y puede ser obtenida a través de celulosa I por diferentes métodos. Mediante tratamientos de hidróxido de sodio concentrado, procesos de mercerización, y mediante solubilización seguida de precipitación y regeneración se puede obtener celulosa II a partir de celulosa I. La celulosa II también es obtenida en forma natural por la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* y por algas de la especie *Halicystis*. La diferencia principal entre celulosa I y celulosa II se basa en las dimensiones de la celda unitaria y la polaridad de las cadenas (9), sus estructuras se muestran en la Figura 7.



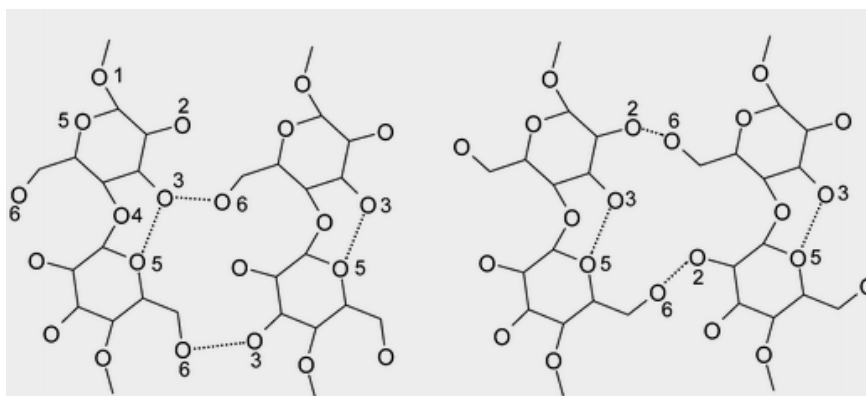


Figura 7: Estructura celulosa I y celulosa II (63)

Las propiedades de la celulosa bacteriana son de alto interés por las diferentes aplicaciones que puede llegar a tener, éstas se encuentran resumidas en la Tabla 1. La CB es elástica y tiene alta resistencia a la tracción, además, su estructura reticulada proporciona un índice de cristalinidad entre el 60 y 70% y un área superficial accesible 200 veces mayor al polímero vegetal. Más aún, la celulosa es gelatinosa ya que su componente líquido, usualmente agua, presente en los huecos entre las cintas muy finas, es de 95% en peso. Si este componente se somete a un secado, conduce a hojas similares al papel teniendo un grosor de 0,01-0,5 mm y buenas propiedades de absorción.

Alto grado de cristalinidad
Mayor área de superficie que la pulpa de madera convencional
Densidad de hoja de 300 a 900 kg·m <sup>-3</sup>
Alta resistencia a la tracción
Alta absorción
Alta elasticidad y durabilidad
No-tóxico
Inactividad metabólica
Biocompatibilidad
Susceptible a la degradación
Gran retención de forma
Fácil adaptación a las propiedades fisicoquímicas

Tabla 1: Propiedades de la celulosa bacteriana

La CB no solo tiene propiedades en condiciones normales sino también al agregar componentes al cultivo puede modificar y potenciarlas. Derivados de la celulosa, ácidos sulfónicos, fosfatos de alquilo y otros polisacáridos (almidón, dextrano) son componentes que introducidos en el cultivo alteran la morfología macroscópica, la resistencia a tracción, la densidad óptica y sus propiedades de absorción. Al mismo tiempo, la combinación con otras sustancias es posible, tal como celulosa seca, obteniendo composites con propiedades fisicoquímicas especiales. Algunas de estas sustancias incluyen alúmina, vidrio, agar, alginatos, carragenato, pululano, dextrano, poliacramida, heparina, polihidroxilalcoholes, gelatina, colágeno, entre otros (8).

Debido a la alta cristalinidad y estructura nanométrica, se ha encontrado que la CB tiene excelentes propiedades mecánicas, por lo cual es muy utilizada en materiales compuestos como refuerzo. Los estudios realizados sobre la celulosa bacteriana han sido sobre láminas secas y se





han obtenido valores de módulo de elasticidad de entre 16 y 18 GPa (9), así mismo se han obtenido 250MPa en el esfuerzo de tracción. Por otro lado, se ha observado que estas propiedades se potencializan si se hacen tratamientos posteriores como la limpieza con hidróxido de sodio ya que retiran impurezas de la red celulosa y se produce una mejor interacción entre las nanofibras (9). En la Tabla 2 se comparan propiedades mecánicas de la CB con otros materiales orgánicos.

Material	Módulo Elasticidad (GPa)	Esfuerzo a la tracción (MPa)	Enlogación (%)
<b>Celulosa Bacteriana</b>	15-35	200-300	1,5-2,0
<b>Polipropileno (PP)</b>	1-1,5	30-40	100-600
<b>Polietileno Tereftalato (PET)</b>	3-4	50-70	50-300
<b>Celofán</b>	2-3	20-100	15-40

*Tabla 2: Propiedades mecánicas de la celulosa bacteriana y otros materiales orgánicos (9)*

La solubilidad es otra característica de la celulosa que es de alto interés y depende esencialmente de su estructura, peso molecular y origen. Para disolver la CB se utilizan diferentes productos químicos como algunos ácidos concentrados como ácido sulfúrico, clorhídrico y nítrico. Para el caso de que se requiera aplicar técnicas de fabricación de fibras o regenerar la CB es importante la solubilidad de la celulosa y se ha demostrado que se logra la disolución utilizando una solución del 8,5% de NaOH y agregando el 1% de urea (9).

Una de las propiedades que ha hecho que la celulosa bacteriana tome tanta importancia es que tiene una total biodegradación en la naturaleza. Una parte importante del ciclo de carbono, realizada por microorganismos, es la degradación de los polímeros de las plantas y es crítico debido a que es la principal entrada de carbono orgánico en los suelos. En los suelos bien aireados, la celulosa se degrada y utiliza microorganismos aerobios (hongos, mixobacterias y otras eubacterias) para su desintegración. Así mismo, en el rumen, que es el tracto digestivo de los animales herbívoros, y en condiciones anaeróbicas, las bacterias y algunos hongos atacan la celulosa. El sistema más eficiente de degradación de la celulosa es el rumen, donde el 90% de la celulosa se metaboliza por parte de la población microbiana (13).

Por otro lado, la CB no es completamente pura, sino que contiene ciertas impurezas como células completas de *G. xylinus* y componentes del cultivo (8). Al requerir alta pureza de la celulosa, se necesita retirar estas impurezas y uno de los métodos más utilizados de purificación para tratamiento de la CB se basa en solución de hidróxidos (principalmente de sodio y potasio), clorato de sodio o hipoclorito, ácidos diluidos, solventes orgánicos o agua caliente. Sumergir la celulosa en estas soluciones por 14-18h, en algunos casos hasta 24h, a elevadas temperaturas, 55-65°C, reduce el número de células y el grado de coloración (8).

La morfología macroscópica de la celulosa bacteriana depende estrictamente de las condiciones de cultivo que puede ser estático o agitado. Durante el cultivo estático, la bacteria acumula esteras en la superficie de la interface rica en oxígeno y nutrientes. Las fibrillas de celulosa son extruidas continuamente desde los poros linealmente ordenados hasta la superficie de la célula bacteriana, cristalizadas en microfibrillas y las bacterias son forzadas a ir más profundo en el medio de crecimiento. Las hebras producidas por este tipo de cultivo se interconectan menos

frecuentemente que en un cultivo agitado. En un cultivo agitado se forman granos irregulares, estrellados y hebras fibrosas bien dispersadas en el medio de cultivo como se muestra en la Figura 8 (8). Dado a esto, el cultivo estático tiene bajo rendimiento, sin embargo se genera la mayor parte de celulosa por fermentación agitada en las intenciones comerciales, por su formación de celulosa esférica y mejor rendimiento. Este acomodo esférico de la celulosa tiene menor cristalinidad, menor propiedades mecánicas y menor grado de polimerización comparado a la película del cultivo estático (11).



Figura 8: : Celulosa bacteriana en cultivo estático (izquierda) y celulosa bacteriana en cultivo agitado (derecha)

La celulosa bacteriana es sintetizada por diferentes géneros de bacterias, de las cuales *Acetobacter* es la más conocida. En la Tabla 3 se pueden observar los diferentes géneros productores de celulosa bacteriana con la estructura obtenida. La estructura del polímero depende del organismo, aunque la vía de la biosíntesis y el mecanismo de su regulación son comunes para la mayoría de bacterias productoras de CB (8).

Genus	Estructura de la celulosa
<i>Acetobacter</i>	Compuesta de cintas y película extracelular
<i>Achromobacter</i>	Fibrillas
<i>Aerobacter</i>	Fibrillas
<i>Agrobacterium</i>	Fibrillas cortas
<i>Alcaligenes</i>	Fibrillas
<i>Pseudomonas</i>	Fibrillas no distinguibles
<i>Rhizobium</i>	Fibrillas cortas
<i>Sarcina</i>	Celulosa amorfa
<i>Zoogloea</i>	No bien definida

Tabla 3: Bacterias productoras de CB (8)

Las bacterias de la especie *Gluconacetobacter*, antes conocida como *Acetobacter*, son aeróbicas y presentan formas alargadas como se observa en la Figura 9 donde se muestra la imagen de *G. xylinus*. Estas bacterias pueden ser encontradas en fruta en descomposición y comercialmente se utilizan para obtener vinagre a partir del vino produciendo ácido acético a partir de etanol y para la fabricación de cervezas de alto nivel de acidez (9).



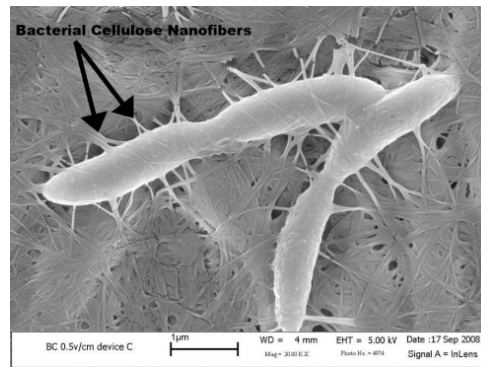


Figura 9: Imagen de *Gluconacetobacter xylinus*

Es importante señalar las infinitas aplicaciones que tiene la celulosa bacteriana en el campo de la tecnología de los materiales, industria alimentaria, medicina y del papel así como en la electrónica, entre otras (11). Respecto al campo de la tecnología de los materiales, con CB se han realizado composites satisfactorios con propiedades únicas; en el campo de la industria alimentaria se han desarrollado empaques antimicrobianos y biodegradables; en la medicina, es un material excelente para apósitos de heridas y quemaduras; y finalmente, en la industria del papel es un componente aditivo que mejora las propiedades. Aplicaciones diversas que tiene la CB incluyen ser materia prima para desarrollo de productos con propiedades únicas y que es un material de gran absorbencia (8).

Los composites realizados con celulosa bacteriana pueden contenerla tanto como en la matriz como en el refuerzo. Debido a las pequeñas dimensiones laterales de las nanofibras individuales de la CB, la convierten en un material muy interesante para los refuerzos (14). Composites de CB se han sintetizado tanto por métodos in situ y ex situ, para el primer método los materiales de refuerzo se añaden al polímero durante su síntesis y para el segundo método la CB se impregna con materiales de refuerzo. En la Tabla 4, se indican los diferentes composites con celulosa bacteriana que ya ha sido sintetizados y la aplicación que tienen. Un composite de CB puede ser tanto de un material orgánico como inorgánico como por ejemplo polímeros, metal, óxidos metálicos, materiales sólidos o nanomateriales (14).

Material de refuerzo	Función	Campo
<b>Nanoplatelet grafito</b>	Conductividad eléctrica	Electrónica
<b>Acido Poli-4-estirenosulfónico</b>	Flujo redox de baterías	Electrónica
<b>Quitosano</b>	Nanofilm	Biomédica/Industrial
<b>Hidroxiapatita</b>	Ingeniería de tejido óseo	Biomédica
<b>Nanopartículas de plata</b>	Apósito de heridas antimicrobiano	Biomédica
<b>Parafina</b>	Armazón Óseo	Biomédica
<b>Poliuretano</b>	Sustrato de película de diodo	Electrónica
<b>Alcohol Polivinílico (PVA)</b>	Implantes de córnea	Biomédica

Tabla 4: Composites de CB y su aplicación (14)

La estructura tridimensional de la CB es una propiedad que ayuda a su uso en la ingeniería de tejido óseo ya que facilita el anclaje y la proliferación de las células que conformaran un nuevo tejido (5). Tal como se observa en la Tabla 4, al hacer un composite con hidroxiapatita se utiliza en

la sustitución de tejido óseo y con alcohol polivinílico (PVA) se utiliza para implantes de córnea, la cual muestra una alta biocompatibilidad y ausencia de necrosis en el tejido implantado (5). Así mismo, para la sustitución de tejido, se utilizan hidrogeles formados por celulosa bacteriana y colágeno debido a que presentan una resistencia a la compresión mayor que la de la estructura de la celulosa vegetal y muy cercana a la de un tejido cartilaginoso, siendo un material ideal para este uso (5).

En la Tabla 4, también se observa que los materiales compuestos de celulosa bacteriana tienen aplicación en el campo de la electrónica como son los sensores de glucosa. Los convencionales están recubiertos por membranas de celulosa pero presentan el problema de que tienen una vida útil muy corta. Si los sensores se recubren con celulosa bacteriana, Ammon y colaboradores en 1995, encontraron que la vida útil aumenta así como la estabilidad al contacto con la sangre (5).

Otro rasgo de la CB en el campo de la electrónica, es el desarrollo de membranas de alta conductividad eléctrica y dispositivos emisores de luz al incorporar metales a la estructura de la celulosa. Se han modificado algunas membranas con metales como por ejemplo platino y paladio para ser utilizados como celdas de combustible y como reactores catalíticos en procesos industriales como en la petroquímica y, éstas han mostrado una excelente adhesión de las sustancias introducidas (5).

Por otra parte, en el campo de la industria alimentaria, la celulosa bacteriana se usa para hacer *nata de coco* que es un postre tradicional filipino gelatinoso pero, actualmente, tiene otras aplicaciones en este campo. La *nata de coco* es una gelatina suave y fibrosa, baja en colesterol, grasa y calorías, la cual se sintetiza a través de la fermentación estática de agua de coco y, actualmente es un medio prometedor para la producción de bioetanol de manera continua en términos de rentabilidad y resistencia estructural (7).

Un rol muy importante de la industria de alimentos es proteger y preservar la comida. La actual tendencia es hacer empaques biodegradables o amigables con el medio ambiente, lo cual hace que la CB sea identificada como material adecuado ya que consiste en una red fina, biodegradable y alto rendimiento a la resistencia de agua. También, la celulosa bacteriana tiene diversos usos dentro de este campo, tal como se resumen en la Tabla 5. (11)

Material	Función	Tipo de comida
<b>CB con nisin</b>	Embalaje antimicrobiano	Carne
<b>CB con polilisina</b>	Embalaje biodegradable	Salchichas
<b>CB</b>	Emulsionantes	Surimi
<b>Carboximetilcelulosa</b>	Regular la reología de la masa	Masa de harina
<b>Hidroxipropil metil celulosa</b>	Mejorar textura	Nata
<b>Metil celulosa</b>	Aumentar vida útil	Huevo
<b>Metil celulosa</b>	Aumentar biodisponibilidad	Vitamina C

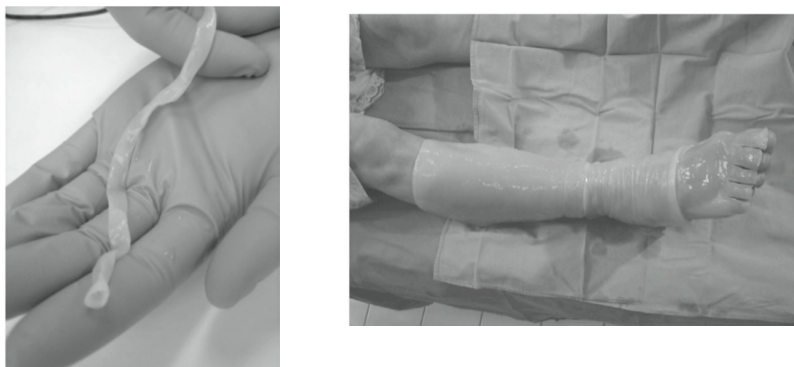
Tabla 5: Resumen de aplicaciones de CB y sus composites

En cuanto al rubro de la medicina, la celulosa bacteriana ha sido utilizada satisfactoriamente como sustituto temporal de la piel para el tratamiento de heridas, quemaduras, úlceras y abrasiones en la epidermis (5). Una almohadilla de celulosa de un cultivo estático, cumple con todos los



estándares de cualquier apósito para heridas moderno, observado en la Figura 10. Es esterilizable, biocompatible, poroso, elástico, fácil de manejar y almacenar. Al mismo tiempo que absorbe exudación, proporciona humedad óptima, la cual es esencial para la rápida cicatrización de heridas, protección de la piel ante infecciones y lesiones mecánicas. Otras de las ventajas del apósito de CB es que no se pega al tejido regenerado y alivia dolor por la absorción de calor de quemaduras (8). En una investigación Maneerung y colaboradores desarrollaron un composite de CB y nanopartículas de plata, que mostró una efectividad para reducir el número de microorganismos infecciosos tanto de Gram-positivos como Gram-negativos en las heridas (5).

Klemm y colaboradores en 2001 también desarrollaron otra aplicación médica con implantes vasculares para microcirugía gracias al diseño de un reactor que permitía la obtención de CB en forma tubular (5). Los implantes de vasos sanguíneos se ilustran en la Figura 10. Éstos fueron probados en cerdos donde se encontró que presentaban excelente compatibilidad con los tejidos animales. Otros investigadores científicos, modificaron la superficie de los implantes para mejorar la adhesión de las células y se llegó a la conclusión que el soporte tiene excelente resistencia mecánica, además de permitir la proliferación de keratocitos humanos y conservar su viabilidad (5).



*Figura 10: Un vaso sanguíneo artificial sintetizado por la bacteria *G. xylinus* (Izquierda), Almohadilla de CB para heridas (Derecha) (15)*

Finalmente dentro del campo médico, la celulosa bacteriana también se utiliza como cultivo para células de mamíferos, inmovilización de enzimas y otras biomoléculas, sustrato para cultivos de tejidos y en el uso en sistemas de liberación controlada de medicamentos. La posibilidad de inmovilizar células también ha sido evaluada en procesos como la producción de vino y etanol con levaduras inmovilizadas (5).

En procesos de separación, las membranas de CB han tenido estudios satisfactorios donde han presentado una buena selectividad pero el flujo de permeado es demasiado bajo. Se ha analizado en la permeación de soluciones de suero bovino, siendo su porcentaje de retención entre 67% y 99%. También se han utilizado las membranas para separación de polioles, clarificación de zumo de frutas, pre evaporación de mezclas etanol-agua, permeación de gases y diálisis (5).

En el rubro de industria del papel, la celulosa bacteriana ha sido objeto de estudio ya que su uso en la fabricación de papel aporta propiedades como alta durabilidad, resistencia y flexibilidad (7). La compañía Mitsubishi Paper Mills Co. junto con Ajinomoto estudiaron el uso de CB para la fabricación de papel y observaron una mayor durabilidad y flexibilidad, siendo características ideales en su uso como papel moneda o materia prima en la elaboración de libros (12). Además, gran cantidad de investigaciones se enfocan en papel electrónico utilizando CB ya que puede

formar hojas de aproximadamente 100 micrómetros de grosor por un proceso de síntesis húmedo. La celulosa bacteriana produce un sustrato resistente que permite implantar dopantes conductores y tintes electrocrómicos al papel. Los colorantes biestables cambian de color con cambios de voltaje adecuados, que al colocarse en estructura de píxeles, permite que se formen imágenes. Más aún, existen investigaciones que aplican la CB como sustrato en dispositivos electrónicos con el potencial de ser utilizados en forma de comprimidos de libros electrónicos, periódicos electrónicos, fondos de pantalla dinámicos, herramientas de aprendizaje y mapas regrabables (16).

Otras de las aplicaciones interesantes que tiene la celulosa bacteriana en otros rubros es la fabricación de armaduras, pantallas flexibles, filtros purificantes, creación de baterías novedosas y gel absorbente en la industria automotriz y biocombustible. Las armaduras pueden ser fabricadas con celulosa bacteriana ya que está compuesta por una densa cantidad de cristales que hacen una estructura extremadamente dura con una relación resistencia-peso ocho veces mayor a la del acero inoxidable. Pioneer Electronics está experimentando con este material para fabricar pantallas muy delgadas y flexibles gracias a que es ligero, transparente y resistente. También la nanoestructura de la celulosa bacteriana podría ser útil para crear filtros que purifiquen el agua, la sangre o incluso atrapar sustancias químicas malignas que se encuentran en el cigarro. Actualmente, las colillas de cigarros se fabrican de acetato de celulosa, lo cual significa que la CB puede ser un excelente sustituto para la fabricación de colillas pero biodegradables. Así mismo, la celulosa se puede combinar con el grafeno para crear baterías que se recarguen al ser dobladas. La CB al mismo tiempo puede ayudar a crear una espuma que soporte 10 mil veces su peso siendo tan absorbente para ser utilizado como compresas o tampones. Finalmente, en la industria automotriz podría sustituir materiales utilizados que disminuyan peso y por consecuencia aumente el rendimiento del combustible (17). En la Tabla 6 se resumen las aplicaciones en diferentes industrias de la celulosa de origen bacteriano (12).

<b>Industria</b>	<b>Aplicaciones</b>
<b>Cosmética</b>	Estabilización de emulsiones, acondicionadores, cremas. Creación de uñas artificiales
<b>Textil</b>	Material de alta absorción acuosa
<b>Refinería</b>	Material para absorción de toxinas y aceites
<b>Papel</b>	Restauración de documentos, papel de alta calidad
<b>Alimentos</b>	Aditivo de alimentos, emulsionante, fibra dietética
<b>Maquiladora</b>	Componente de partes y refacciones
<b>Turística</b>	Ropa deportiva y ropa de acampar
<b>Investigación</b>	Inmovilización de proteínas y células, resinas para cromatografía
<b>Tecnología</b>	Diafragmas de alta sensibilidad en micrófonos y audífonos
<b>Medicina</b>	Fabricación de “piel artificial” en terapia de quemaduras.

*Tabla 6: Aplicaciones industriales de la celulosa de origen bacteriana*





## 2.5. Teoría 3: Obtención de Celulosa Bacteriana

La síntesis de la CB es un proceso regulado multi-etapa que involucra un largo número de enzimas y complejos de proteínas catalíticas y regulatorias. El proceso incluye la síntesis de urididín difosfato glucosa (UDP-G), el cual es el sustrato precursor de la celulosa, seguido por la polimerización de glucosa a  $\beta$ -1,4-glucano y la asociación de cadenas nacientes en una estructura característica en forma de cinta hecha por miles de cadenas individuales de celulosa (8).

La celulosa sintetizada por *G. xylinus* es un producto final del metabolismo de carbono que, dependiendo del estado fisiológico de la célula, puede involucrar el ciclo de Krebs o el ciclo de pentosa fosfato (8). El ciclo de Krebs participa en la oxidación de carbohidratos mientras que el ciclo de pentosa fosfato oxida ácidos orgánicos (12). Así mismo, la síntesis de CB está asociada fuertemente con procesos catabólicos de oxidación y consume hasta un 10% de la energía derivada de reacciones catabólicas, a pesar de este hecho no interfiere con otros procesos anabólicos como la síntesis de proteínas (8).

*G. xylinus* convierte diferentes fuentes de carbono, tal como hexosas, glicerol, dihidroxiacetona, piruvato y ácidos dicarboxílicos en celulosa con un 50% de eficiencia normalmente (18). El piruvato y los ácidos antes mencionados entran al ciclo de Krebs y a causa de la descarboxilación del oxalacetato del piruvato, se somete a una conversión de hexosas vía gluconeogénesis, parecido a glicerol, dihidroxiacetona y los intermedios en el ciclo de pentosa fosfato (18).

En la Figura 11 se observa la vía bioquímica para la síntesis de la celulosa bacteriana hecha por la bacteria *G. xylinus*. Se observa que la enzima GK (gluquiniasa), transforma la glucosa en glucosa-6-fosfato, como siguiente paso la PMG (fosfoglucomutasa), transforma éste último en glucosa-1-fosfato. Consecutivamente, se da la obtención de UDP-G gracias a la acción de la enzima UGP (pirofosforilasa uridina difosfoglucosa), a través de la transformación de glucosa-1-fosfato. Y finalmente la CS (celulosa sintetasa) produce celulosa a partir de UDP-G (18).



Figura 11: Vía bioquímica de la síntesis de celulosa bacteriana a partir de glucosa

La biosíntesis de celulosa tanto en plantas como procariotas es catalizada por la uridina difosfato (UDP) formando celulosa sintetasa. La CS es una proteína normalmente anclada a la membrana celular con una masa molecular de 400-500 kDa y está unida a la membrana

citoplásmica. Es de sospecha que los complejos oligoméricos de la CS, que frecuentemente se llaman complejos terminantes, son los responsables por la síntesis de las cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano. Debido a la ubicación, la purificación de la CS es muy difícil y la insolación de la fracción de membrana es necesaria antes de la purificación y solubilización de la CS. La insolación de la proteína de las membranas se puede llevar a cabo utilizando digitonina o detergentes y tratamientos con tripsina seguido por el atrapamiento de celulosa por la celulosa sintetasa (8). Los autores Brown y Saxena afirman que la subunidad catalítica de *G. xylinus*, CS, opera de la misma manera que el procesamiento de glicosiltransferasas, es decir, cataliza la síntesis de celulosa directo en el enlace glicosídico (19). El análisis microscópico de la celulosa sintetasa purificada indica que la enzima tiende a formar agregados tetraméricos u octaméricos (8).

La síntesis de celulosa I alomorfa estable de cualquier microorganismo productor ya sea, *G. xylinus* o plantas, involucra dos pasos intermediarios. El primer paso es la polimerización de moléculas de glucosa a  $\beta$ -1,4-glucano y el segundo paso es el ensamble y cristalización de cadenas poliméricas nacientes en estructuras supramoleculares, lo cual es muy característico de cada organismo productor de celulosa (8). Asumiendo que el dominio globular de la celulosa sintetasa se encuentra localizado del lado citoplásmico de la membrana celular, la transferencia de cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano a través de la membrana fuera de la célula es necesaria. Estos tres pasos están acoplados y el grado de polimerización está limitado a la velocidad de ensamble y cristalización (8).

La formación de CB está catalizado por los complejos alineados linealmente de la CS en la membrana citoplásmica de *G. xylinus*. Debido a que los complejos pueden polimerizar 200.000 moléculas de glucosa por segundo, es un proceso que se realiza con gran velocidad. Se han propuesto dos hipótesis para el mecanismo de reacción, ya que actualmente no está claro, la primera hipótesis afirma que no involucra lípidos intermediarios en la polimerización y la hipótesis contraria afirma que un lípido fosfato con un carácter polisoprenoide toma parte en la biosíntesis (8).

La primera hipótesis desarrollada por Brown (19), coincide con el hecho de que las glicosiltransferasas, responsables de la síntesis de homopolisacáridos ramificados, son enzimas procesadoras (8). De acuerdo a este modelo, existen tres lugares catalíticos en el fragmento globular de la subunidad catalítica de la celulosa sintetasa, similarmente a otros procesos de glicosiltransferasas. El primer lugar catalítico, 2a en la Figura 12, liga dos moléculas de UDP-G; el segundo lugar catalítico, 1a en la Figura 12, contiene el residuo de ácido aspártico crucial y cataliza la formación de la vinculación entre los dos residuos de glucosa, acompañado por la liberación de dos moléculas de UDP. Finalmente, el tercer lugar catalítico, 3a en la Figura 12, tira del extremo reductor de la celobiosa sintetizada (8), la cual es un disacárido formado por dos glucosas unidas por los grupos hidroxilo del carbono 1 en posición beta de una glucosa. La estructura de la celobiosa se observa en la Figura 13 (20).





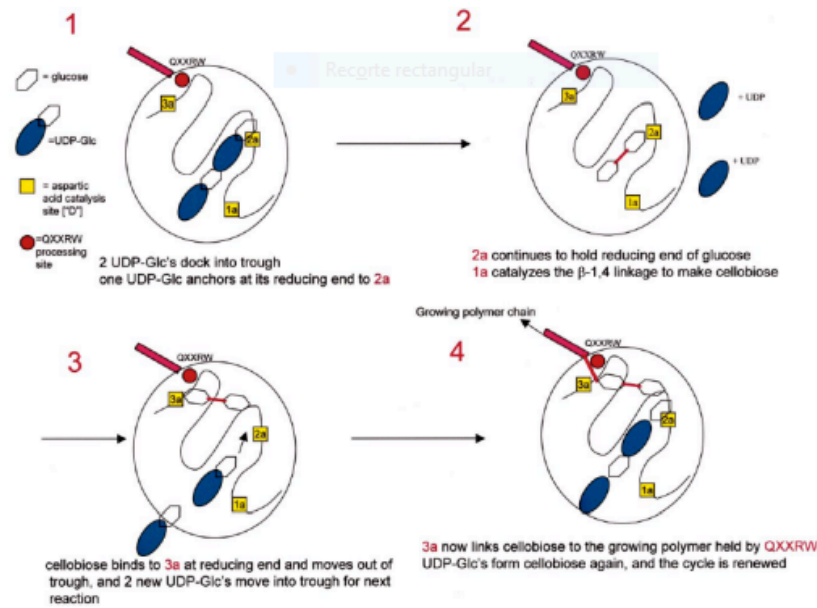


Figura 12: Concepto generalizado para las reacciones de polimerización que lleva a la biosíntesis de cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano (8)

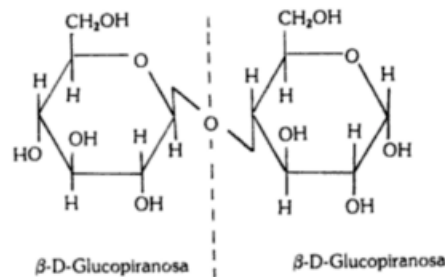


Figura 13: Estructura de la celobiosio (20)

La celobiosio deja el área 1a-2a, la cual puede enlazar dos moléculas subsecuentes de UDP-G y forma una segunda molécula de celobiosio. En el siguiente paso, el extremo reductor de esta molécula es forzada al lugar de extrusión, mientras la segunda molécula es ligada al extremo no-reducido de la primera, obteniendo celotetralosa. El área vacía 1a-2a puede enlazar dos moléculas subsecuentes de UDP-G, para repetir el ciclo de reacciones, uniendo dos moléculas más de glucosa a la cadena (8).

Otros estudios de Koyama et al. (21) confirman este modelo ya que demostraron que los residuos de la glucosa son añadidos al extremo no-reducido del polisacárido y que los extremos reducidos del polímero naciente están situados fuera de la célula. Además, el ángulo de torsión entre dos residuos de glucosa adyacentes en la molécula de celulosa es de  $180^\circ$ . Por este motivo, la adición de residuos de celobiosio a la creciente cadena, en lugar de restos individuales de glucosa, favorece a mantener el eje del  $\beta$ -1,4-glucano en su sitio (19). Así mismo, Kuga y Brown en 1988 probaron que las cadenas de la celulosa eran extruidas fuera de la célula, empezando por su extremo reducido (8).

La segunda hipótesis de cómo es el proceso de reacción lo propusieron Han y Robyt en 1998, a razón de su estudio con *G. xylinus* ATCC 10821. Estos autores llegaron a la conclusión que un lípido pirofosfato con un carácter piropinoide toma parte en la biosíntesis. Según ellos, la formación de un lípido intermediario durante la biosíntesis de la celulosa bacteriana fue confirmada por la extracción de un 33% del experimento de pulso con una mezcla de cloroformo y metanol. Esta extracción fue imposible ya que cuando la longitud de la cadena del polisacárido supera entre 8 y 10 residuos de azúcar, el complejo con lípidos se hace insoluble con la mezcla de extracción (8).

Han y Robyt propusieron que la biosíntesis de la CB involucra tres enzimas principales incrustadas en la membrana citoplasmática: celulosa sintaza, UDP-G fosfotransferasa y lípido pirofosfato fosfohidrolasa (LPP). El mecanismo de reacción, llamado reacción de inserción (*insertion reaction*) se ilustra en la Figura 14. La primera enzima transforma UDP-G en glucosa-1- $\alpha$ -fosfato en el monofosfato del lípido, por consecuencia dando al lípido pirofosfato- $\alpha$ -D-glucosa (LippPP- $\alpha$ -glucosa), en la primera reacción de la Figura 14. La configuración  $\alpha$  en el carbono anomérico, involucrado en la unión fosfoéster glucosa, se mantiene igual que en la molécula de sustrato. El producto secundario de esta reacción es uridin monofosfato (UMP) (8).

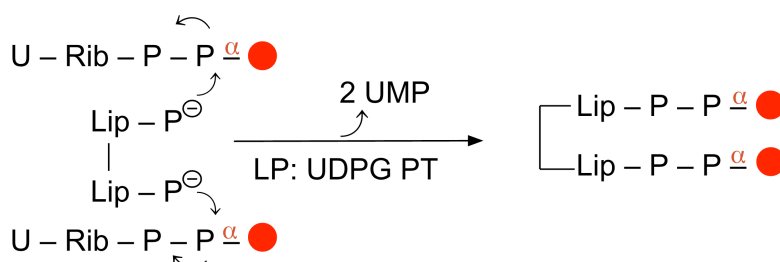


Figura 14: Mecanismo de la biosíntesis de CB: Primera reacción. Lip: Lípido; Rib: D-Ribosa; P: Fosforil;  $\bullet$ : residuo glucosil. LP:UDPG PT: Lípido pirofosfato; UMP: Uridin monofosfato

En la segunda reacción, catalizada por celulosa sintetasa, ilustrada en la Figura 15, el residuo de glucosa es transferido de una molécula de LipPP- $\alpha$ -glucosa a otra molécula y el enlace  $\beta$ -1,4-glucosídico entre dos residuos de glucosa se forma debido al ataque de un grupo hidroxilo en el carbono (8). En la tercera reacción, ilustrada en la Figura 16, ocurre la hidrólisis del lípido pirofosfato formado en el paso anterior y otra molécula de glucosa- $\alpha$ -1-fosfato de UDP-G puede ser unida a la Lip-P, liberada en esta reacción (8). La reacción ilustrada en la Figura 17, es la repetición de la primera reacción donde el lípido monofosfato se adhiere para formar lípido pirofosfato- $\alpha$ -D-glucosa.

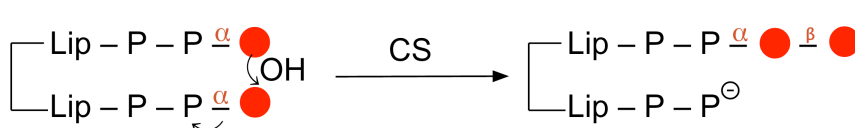


Figura 15: Mecanismo de la biosíntesis de CB: Segunda reacción. CS. Celulosa Sintetasa



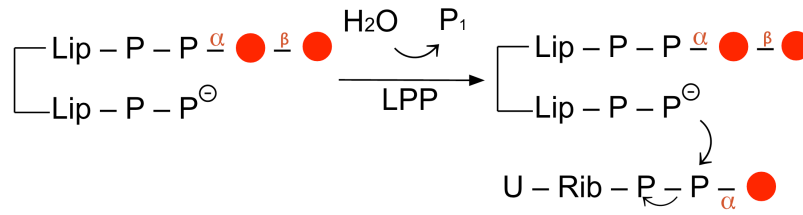


Figura 16: Mecanismo de la biosíntesis de la CB: Tercera reacción. LPP, lípido pirofosfato fosfohidrolasa

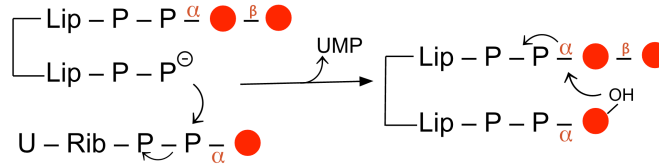


Figura 17: Mecanismo de la biosíntesis de la CB: Reacción en cadena.

El ciclo de estas tres reacciones da por consecuencia la formación de una cadena de  $\beta$ -1,4-glucano con una longitud apropiada. El mecanismo incluye la inversión de una configuración del carbono anomérico en el residuo de glucosa transferido ya sea de una molécula LipPP- $\alpha$ -glucosa a otra o de celobiosa, -triosa, -tetralosa y subsecuentemente n-osa (8), proceso ilustrado en la Figura 18.

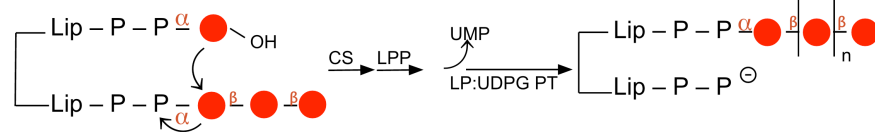


Figura 18: Mecanismo de biosíntesis de la CB: Formación de n-osa

Un aceptor de la cadena alargada de  $\beta$ -1,4-glucano es siempre un residuo único de  $\alpha$ -D-glucosa, unido con una de dos moléculas de Lip-P-P presente en el sistema de polimerización. Esto significa que el alargamiento ocurre desde su extremo reducido y los extremos no-reducidos de celulosa naciente están situados fuera de las células. Esta afirmación de Han y Robyt es completamente contraria al modelo de Brown, según los autores tanto la celulosa sintetasa como las moléculas de Lip-P-P están integradas en la membrana citoplásmica de la célula bacteriana (8).

Al tener dos hipótesis contrarias, se realizaron diferentes estudios para comprobar cuál de ellas era la correcta. La participación de lípidos intermediarios fue confirmada por la síntesis de *salmonella*, *agrobacterium tumefaciens* y *xanthomonas campestris*. Por el contrario, la hipótesis de Brown se confirmó en el año 2000 por la síntesis de celulosa in vitro catalizada por la soluciones de membrana de *G. xylinus* con digitonina y mediante la síntesis de polímeros purificados por subunidades de CS, las cuales ninguna contenía el componente lípido. De acuerdo a las deducciones anteriores, se llegó a concluir que la biosíntesis de celulosa bacteriana no requiere ningún cebador (19).

El paso menos complicado de la síntesis de la CB, sea cual sea el mecanismo de obtención, es la polimerización de moléculas glucanopiranosas a  $\beta$ -1,4-glucano. Las propiedades de la celulosa resultan de las etapas que suceden durante este proceso, lo que significa que la extrusión de las cadenas y su unión fuera de la célula con la posterior obtención de estructura supramoleculares, son esenciales. Lo más relevante en estos procesos es la organización específica de los complejos multiméricos de la celulosa sintetasa, los cuales son anclados a la membrana citoplásmica. En células de *G. xylinus* estos complejos son ordenados linealmente a lo largo del eje vertical de la célula, conteniendo cada una entre 70 y 80 complejos terminantes (8).

Al hacer cambios en el cultivo de la CB, se pueden obtener cambios muy significativos en la organización supramolecular. Por ejemplo, al tener una aireación más fuerte o en la presencia de ciertas sustancias puede provocar un cambio de forma resultante. La presencia de sustancias en el cultivo que no puedan penetrar dentro de las células pero puedan formar enlaces de hidrógeno, causa que en lugar de tener un polímero con forma de cinta, tal como la forma metaestable de celulosa I que sus fibrillas son colineares con los complejos de la CS, se obtiene una forma termodinámicamente más estable que es la celulosa II amorfa (8). En la Figura 19 se ilustra el modelo de la formación de subfibrillas de *G. xylinus*.

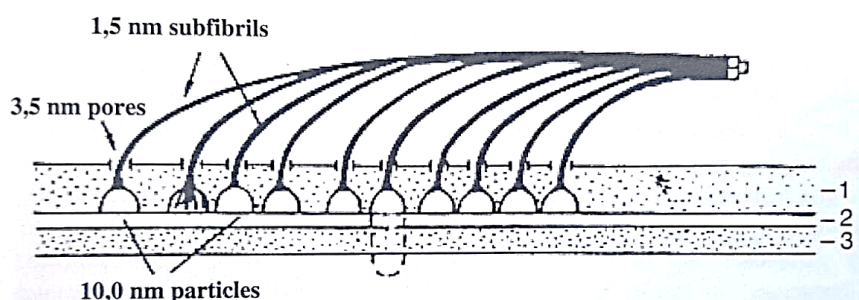


Figura 19: Modelo de *G. xylinus* de la formación de subfibrillas de celulosa. 1- capa lipopolisacárida; 2- espacio periplásmico; 3- plasmalema. (8)

El ensamble espacial de las cadenas de  $\beta$ -1,4-glucano tiene un carácter jerárquico que se observa en la Figura 19. En la primera etapa del proceso, entre 10 y 15 cadenas nacientes de  $\beta$ -1,4-glucano forman una subfibrilla, también conocida como protomicrofibrilla de 1,5 nm de diámetro con una forma de tripe hélice. Estas subfibrillas se unen para formar microfibrillas compuestas por numerosas cadenas paralelas. La siguiente estructura en la jerarquía es un haz de microfibrillas, seguidas por una cinta enrollada, comprendida por 1000 cadenas individuales de  $\beta$ -1,4-glucano (8).

Por otro lado, la organización molecular de poros, a través de los cuales las microfibrillas de celulosa de *G. xylinus* migran al exterior de la célula, sigue siendo desconocido (8). Por el contrario, Cruz afirma que *G. xylinus* presenta externamente un arreglo entre 50 y 80 poros localizados a lo largo del eje axial de la membrana celular, también llamados tactoides. Así mismo, señala que las cadenas se unen para formar fibrillas de alta cristalinidad con dimensiones entre 1,5 y 4 nm y, debido a la presencia de enlaces de hidrógeno, las fibrillas se



ensamblan a su vez para formar nanofibras de celulosa, con forma de cinta torcida. Las cintas torcidas tienen un ancho en el rango de 50 a 145 nm y altura de hasta 4 nm (9).

La dinámica del proceso de ensamble de las cadenas nacientes de celulosa es único y extraordinario. La extrusión de estas cadenas y su ensamble en estructuras ordenadas es asistida por la alteración del movimiento de las células. Durante todo el proceso de la síntesis y secreción de  $\beta$ -1,4-glucano la célula de *G. xylinus* gira simultáneamente sobre su propio eje (movimiento de desenrollado). Este movimiento es accionado mediante la formación de giros en las cintas, localizado en la superficie lateral de la célula alargada, éstos se pueden notar debajo de un microscopio electrónico (8).

La regulación de la síntesis de celulosa bacteriana ha sido motivo de investigación y es de gran interés ya que es una forma de acelerar el proceso de obtención a través de métodos sencillos como agregar iones o moléculas activadoras. Un componente que tiene un rol crucial en la regulación de toda la biogénesis de  $\beta$ -1,4-glucano es un activador reversible alostérico de *G. xylinus* llamado ciclo-3,6':3'6 digonosina monofosfato (c-di-GMP) representado en la Figura 20. Este compuesto se une a la subunidad regulatoria de la enzima e induce cambios conformacionales que facilitan la asociación de los promotores de la CS y conducen a una mejora de su reactividad (8).

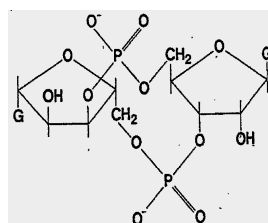


Figura 20: Estructura química de c-di-GMP (8)

La concentración de c-di-GMP se regula con tres enzimas: diguanil ciclasa (CDG), fosfodiesterasa A (PDEA) y fosfodiesterasa B (PDEB). Las últimas dos se localizan ancladas a la membrana citoplásmica mientras que la primera tiene dos formas, una de ellas se encuentra anclada a la membrana citoplásmica y la segunda opera en el citoplasma. La CDG es la enzima reguladora clave en el sistema de síntesis de CB y está compuesta por dos cadenas polipeptídicas y codificada por dos genes. Así mismo, la CDG se activa por iones de magnesio  $+2$  ( $Mg^{2+}$ ) y es especialmente inhibida por saponina, un terpenoide glicosinada. De la misma manera, convierte dos moléculas de Guanósín trifosfato (GTP) primero en diguanosina monofosfato lineal y posteriormente en la cíclica (c-di-GMP) la cual activa la celulosa sintetasa (8).

Dentro del mismo proceso de regulación, la PDEA y PDEB cumplen funciones fundamentales y es por eso que es necesario el estudio de sus inhibidores y sus activadores. La PDEA divide c-di-GMP activo en un dímero inactivo lineal, que la PDEB lo descompone aún más en dos moléculas de 5'GMP (Guanósín monofosfato). Los iones de calcio  $2+$  ( $Ca^{2+}$ ) inhiben la enzima PDEA y no afectan a la enzima PDEB, por lo que la concentración de estos iones afecta indirectamente a la producción de celulosa. Es decir, una concentración alta de  $Ca^{2+}$  mejora la producción ya que la conversión de c-di-GMP a la forma lineal inactiva es inhibida (8).

### Factores que influyen en la obtención de Celulosa Bacteriana

Con respecto a los factores que afectan a la tasa de producción de celulosa bacteriana, éstos han sido ampliamente estudiados para poder aumentarla y tener una rentabilidad mucho mayor a la que se tiene actualmente. Las fuentes de carbono y nitrógeno, el pH, la temperatura, los tipos de cultivo y de fermentadores son unos de los factores que tienen un impacto directo en la obtención de la CB (12). Una producción alta de CB se puede lograr con una composición y condiciones de medio de crecimiento óptimas y con un diseño con modelos matemáticos y análisis por ordenador (8).

Existen diferentes fuentes de carbono como alimento para las bacterias para la producción de celulosa tal como glucosa, polisacáridos, disacáridos, alcoholes y ácidos orgánicos. Johnas y Farrah en 1998 hicieron comparaciones de estas fuentes de carbono y llegaron a la conclusión que las mejores fuentes de carbonos son d-arabitol y d-manitol, los cuales dieron una producción 6,2 y 3,8 mayor, respectivamente, en comparación a la glucosa. Ambos azúcares proporcionan estabilidad al pH durante el periodo de cultivo ya que no fueron convertidos en ácidos glucónicos (8).

Matsuoka investigó en 1996 la presencia de lactato en el medio de crecimiento en un cultivo agitado y, encontró que mejora la producción entre 4 y 5 veces. La fuente de lactato normalmente se encuentra en licor de maíz fermentado (LMF) el cual es uno de los principales componentes del medio aplicado actualmente en producciones de celulosa bacteriana, especialmente en cultivos agitados. El lactato no es convertido en UDP-G, contrariamente a la glucosa o fructosa, es metabolizado vía piruvato y oxalacetato en el ciclo de Krebs siendo una fuente de energía para la producción de celulosa bacteriana (8).

A su vez, se ha encontrado que otro compuesto que estimula la síntesis de celulosa es el etanol. En un cultivo continuo de *G. xylinus* en un medio con contenido de fructuosa, reveló que con 10 g de etanol por litro mejora el rendimiento, pero una concentración de 15 g por litro prevenía la síntesis de polímeros. Con esto se puede afirmar que, al igual que el lactato, el etanol es una fuente de energía acumulada en ATP (Adenosín Trifosfato) y no un sustrato para la síntesis de celulosa. El ATP activa la quinasa fructosa e inhibe glucosa-6-fosfato dehidrogenasa, deteniendo la conversión de éste a 6-fosfogluconato. Debido a ambas reacciones, la cantidad de fructosa isomerizada a glucosa-6-fosfato aumenta (8). En la Tabla 7 se observan diferentes tipos de microorganismos con su fuente de carbono, suplemento, el tiempo de cultivo y el rendimiento (18).



Microorganismo	Fuente de carbono	Suplemento	Tiempo de cultivo	Rendimiento (g/L)
<i>A. xylinum</i> BRC 5	Glucosa	Etanol, oxígeno	50 h	15,30
<i>G. hansenii</i> PJK (KCT 10505)	Glucosa	Oxígeno	48 h	1,72
<i>G. hansenii</i> PJK (KCT 10505)	Glucosa	Etanol	72h	2,50
<i>Acetobacter</i> sp. V6	Glucosa	Etanol	8 días	4,16
<i>Acetobacter</i> sp. A9	Glucosa	Etanol	8 días	15,20
<i>A. xylinum</i> BPR2001	Moladas	-	72h	7,820
<i>A. xylinum</i> BPR2001	Fructosa	Oxígeno agar	72h	14,10
<i>A. xylinum</i> BPR2001	Fructosa	Agar	56h	12,00
<i>Acetobacter xylinum</i> ssp BPR2001	Fructosa	Oxígeno	52h	10,40
<i>Acetobacter xylinum</i> ssp BPR2001	Fructosa	Oxígeno agar	44h	8,70
<i>Acetobacter xylinum</i> E25	Glucosa	-	7 días	3,50
<i>G. xylinus</i> (K3)	Manitol	Té verde	7 días	3,34
<i>G. xylinus</i> IFO 13773	Glucosa	Lignosulfonato	7 días	10,10
<i>Acetobacter xylinum</i> NUST4.1	Glucosa	Alginato de sodio	5 días	6,00
<i>G. xylinus</i> IFO 13773	Molasa	-	78 días	5,76
<i>Gluconacetobacter</i> sp- RKY5	Glicerol	-	144h	5,63
<i>Gluconacetobacter</i> sp. St-60-12 +	Sucrosa	-	72h	4,20

Tabla 7: Diferentes microorganismos productores de celulosa bacteriana (18)

Cada cepa productora de CB necesita un complejo específico de fuente de nitrógeno, proporcionando no solo amino ácidos, sino también vitaminas y minerales. La fuente de nitrógeno de mejor aceptación es extracto de levadura y peptona, los cuales son componentes básicos del medio modelo desarrollado en 1945 por Hestrin y Schramm. Este modelo se basa en 20 g/L de D-glucosa, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de bactopecton, 3,4 g/L de disodio hidrógeno fosfato (DSP) y 1,15 g/L de ácido cítrico. No obstante, el licor de maíz fermentado continúa siendo la fuente de nitrógeno más recomendada.

Respecto al efecto que tiene el pH y la temperatura en la producción de celulosa, se han hecho diferentes experimentos desde 1997 por Tahara et al. (22). Análisis han indicado que el pH óptimo depende de cada cepa y normalmente varía entre 4,0 y 7,0. Ishikawa et al. y Tahara et al. observaron que el rendimiento mayor se obtenía a un pH de 5,0. La temperatura también influye en el rendimiento y el rango óptimo se encuentra entre 28 y 30°C, una variación de la temperatura afecta al grado de polimerización y su capacidad de retención de agua. Por ejemplo, se obtuvo un menor grado de polimerización (aproximadamente 10.000) y una mayor capacidad de retención de agua (164%) a una temperatura de 30°C comparado con una de 35 y 25°C (8).

#### Cultivos agitados y estáticos - Tipos de Fermentadores

La obtención de celulosa bacteriana, como se ha mencionado anteriormente, se puede hacer mediante cultivos estáticos o en condiciones sumergidas (9), que proporciona agitación y



aireación adecuada necesaria para una homogeneidad del medio y transferencia de masa efectiva. La elección de las condiciones de cultivo depende del uso final que se le dará al producto (8).

La eficiencia de cultivos estáticos depende en gran parte en la relación superficie/volumen que protege el cultivo tanto de aireación innecesaria como de falta de aireación, que provocaría una terminación del crecimiento celular y la síntesis de CB. La relación superficie/volumen puede variar de  $2,2 \text{ cm}^{-1}$  a  $0,7 \text{ cm}^{-1}$ . La síntesis se puede lograr, a través de un procedimiento de un paso, con un medio inoculado con 5-10% de suspensión de células, o mediante dos pasos. El procedimiento con dos pasos comienza desde una fermentación agitada seguida por un cultivo estático, pero también se ha hecho a través de dos cultivos estáticos consecutivos, el cual proporcionó un crecimiento bacteriano uniforme y una producción homogénea de películas (8).

El control de la síntesis de CB en un cultivo estático es muy difícil ya que al formarse una película limita el acceso al medio líquido. Se observa un medio estático en la Figura 21, donde la película formada se suspende, desciende a través del medio líquido y las bacterias que permanecen en la parte inferior se inactivan pero podrían ser reactivadas para futuros cultivos (9). Teniendo en cuenta que el pH es un parámetro importante, se requiere controlar ya que se acumulan ácidos keto-glucónicos en cultivos estáticos y disminuye el pH por debajo de los valores óptimos para el crecimiento y síntesis de polisacáridos (8). Al no poderse aplicar métodos convencionales para el ajuste del pH en cultivos estáticos se aplican productos de catabolismo del ácido acético que contrarrestan los efectos de la formación keto-gluconato y proporciona un pH constante de 5,5 durante todo el proceso (18).



Figura 21: Cultivo estático de *Celulosa bacteriana* (9)

Un mejor control de la síntesis de la celulosa bacteriana puede ser logrado con fermentadores especiales, tal como los horizontales ya que proporcionan una combinación entre cultivos estáticos y sumergidos. En un fermentador horizontal el polímero se deposita en la superficie de los rodillos o discos rotando alrededor del eje vertical, parte de esta superficie temporalmente se sumerge en el medio líquido o está por encima de su superficie (en el aire). Las ventajas de este método incluyen una superficie de polímero más grande, la síntesis de la celulosa en forma de fibras huecas, así como un mejor control del proceso, facilidad de escalar, superficie accesible para la adhesión de bacterias, mayor optimización de sustratos, entre otras (8).





Al utilizar fermentadores comunes para síntesis de CB a través de medios sumergidos, al ser estáticos pueden favorecer a la adhesión de células y reducen la eficiencia de la producción. Para poder mejorar la productividad, se agregan algunas micropartículas insolubles en agua al cultivo, tal como arena o perlas de vidrio para evitar la formación de biopelículas sobre las partículas que limita la transferencia de oxígeno y detiene la oxidación de glucosa a ácido gluónico (8).

Para producciones a grande escala, se han observado múltiples problemas con los fermentadores debido a la aparición de mutantes, daño de la estructura del producto y por el atrapamiento de células en la celulosa producida. En fermentadores con agitación continua conlleva al problema de la aparición de mutantes de celulosa negativos, los cuales contribuyen a una disminución de producción de celulosa. Además de que la turbulencia también afecta negativamente a la polimerización y cristalización de celulosa. Por otro lado, incrementar la velocidad de agitación para mejorar la aireación lleva a dañar el producto debido a las fuerzas de corte, por esta razón Bauer et al. en 1992 introdujeron un agente protector de poliacrilamida en el medio de crecimiento, que redujo el daño pero afectó el crecimiento celular a altas densidades. Finalmente, al tener fermentadores de gran volumen las células quedan atrapadas en la celulosa pero para poderlas liberarlas y aumentar su densidad, Brown en 1989 aplicó soluciones de celulasa para una hidrólisis parcial de celulosa (8).

Existen reportes de diferentes reactores que se han utilizado para la producción de celulosa bacteriana que han aportado ventajas y desventajas. El reactor de disco giratorio (RBC), por sus siglas en inglés, contactor giratorio de biopelícula, el biorreactor equipado con filtro giratorio y el reactor con membrana con silicona son los reactores encontrados en la literatura que proporcionan datos técnicos de su producción de CB (18).

El reactor RBC consiste en una serie de discos circulares montados al eje horizontal que rotan y son expuestos alternadamente al medio fermentador y aire. La celulosa producida en este tipo de reactor no se enfrenta a una fuerte tensión de corte y tiene una excelente transmisibilidad de oxígeno, con la cual los microorganismos pueden entrar fácilmente en contacto con él. Con la bacteria *Gluconacetobacter* se maximizó la producción de celulosa bacteriana a 5,52 g/L con un RBC y ocho discos internos, además una aireación constante logró mejorar la producción alcanzando una producción de 5,67 g/L (18).

El reactor de filtro giratorio lo desarrollaron Jung et al., sus investigaciones se llevaron a cabo en un fermentador equipado con un impulsor de turbina de 6 hojas planas y un filtro giratorio consistente en un cilindro rodeado por una malla de acero inoxidable cuyo fondo fue montado en el eje del agitador. El reactor fue utilizado con *G. hansenii* y la producción de celulosa alcanzó 4,57 g/L después de 140 horas de cultivo, resultado que fue 2,9 veces mayor que en un fermentador convencional (18).

El reactor de disco giratorio, por otro lado, está diseñado con unos discos internos donde la superficie de éstos se sumergen en el medio de crecimiento mientras que la otra parte está expuesta a la atmósfera. Como los discos giran continuamente, las células que están atrapadas en la superficie del disco toman los nutrientes cuando están sumergidas en el medio líquido y posteriormente son expuestas al oxígeno presente en la atmósfera. Krystynowicz et al.,

estudiaron las variaciones de las condiciones de cultivo en este reactor y observaron que la máxima producción de celulosa se obtiene cuando la relación superficie/volumen es  $0,71 \text{ cm}^{-1}$  y la velocidad de rotación es de 4 rpm (18).

Por último, el reactor con membrana de silicona se implementó por Yoshino et al. para aumentar la velocidad de producciones de CB por *A. pasteurianus* en un cultivo estático. Este sistema hace que las películas de celulosa sean formadas en una membrana sintética permeable al oxígeno y en una superficie líquida. La rugosidad de la superficie de la membrana, afecta directamente en la velocidad de producción. Se encontró que la producción era cinco veces mayor en una superficie brillante de silicona que en una superficie en relieve (18).

## 2.6. Teoría 4: Estado del arte

Como se menciona anteriormente, la celulosa bacteriana ha sido interés de múltiples estudios científicos en los últimos años, para así obtener las condiciones óptimas de cultivo debido a sus múltiples aplicaciones en diferentes rubros. Por esta razón, la celulosa bacteriana tiene mucho interés comercial pero a pesar de esto, no se ha logrado llegar a la máxima capacidad productora de la bacteria *G. xylinus* debido a la baja rentabilidad económica que tiene. Actualmente los productores más importantes de celulosa bacteriana son Xylos Corp, Fzmb GmbH de Alemania, Sony Corporation y Ajinomoto de Japón pero ninguno de ellos revela su capacidad por políticas internas (18).

Fzmb GmbH cuenta con una planta de celulosa bacteriana establecida en Bad Langensalza, Alemania. Es una empresa dedicada a la investigación en los campos de medicina, biotecnología y construcción de dispositivos. Esta institución fabrica CB, a través de la bacteria *G. xylinus*, en grandes cantidades y está muy interesada en aplicaciones industriales de este biomaterial (23). Esta empresa mantiene en anonimato las cantidades producidas así como su método de fabricación. Por otro lado, con la CB fabrican un producto llamado *Nanomasque* la cual afirman es una base ideal para mascarillas utilizadas en el cuidado profesional de la piel (24).

En el año de 1999, Ishihara y Yamanaka patentaron un método de obtención de celulosa bacteriana innovador. La patente es propiedad de Ajinomoto y se refiere a incluir en el cultivo un inhibidor de división celular provocando un grosor mayor de las cintas de las fibrillas y una mayor resistencia a la tracción (25).

Por otro lado, se han comprobado diferentes métodos para la obtención de la celulosa modificando condiciones de fermentación donde se destaca el sustrato, tipo de bacteria, pH, volumen de reactor, entre otros. También han modificado condiciones de separación ya sea través de membranas, filtros o decantadores; condiciones de purificación y condiciones de almacenamiento. Como se mencionó anteriormente, el número de informes científicos publicados se ha incrementado en los últimos años principalmente con el objetivo de incrementar el rendimiento para poder hacer rentable la producción de CB y así tener un producto comercial.



En el año 2001 Luis Alfonso Caicedo, F.P. De França y L. López estudiaron los factores para el escalado del proceso de CB por fermentación estática. Utilizaron un cultivo mixto de bacterias *Acetobacter* aislado de una cultura del hongo del té y la cepa se conservó en un medio compuesto por infusión de té (*Camelia sinensis*). Se elevó a una temperatura de ebullición durante 15 minutos, con 12 gramos de té seco en 300mL de agua destilada y concentración variable de glucosa. El medio se esterilizó durante 20 minutos a 120°C y se dejó en la estufa por 4 días a 30°C y posteriormente, se almacenó a 4°C. La celulosa fue retirada mediante filtración, lavada con agua destilada y sumergida en 150mL de NaOH al 0,1% en ebullición por 5 minutos para la purificación. Posteriormente fue lavada con agua destilada, colocada sobre láminas de vidrio y secada en estufa a 30°C, se obtienen aproximadamente 4,1 g/L de celulosa con 40 g/L de glucosa inicial. (26)

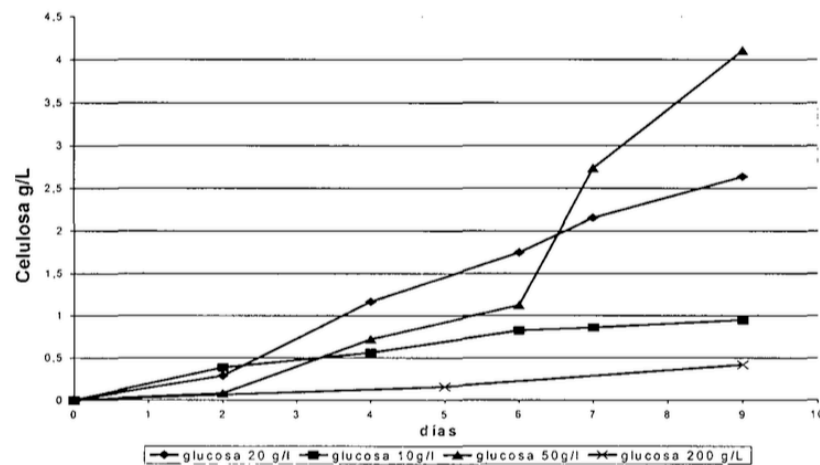


Figura 22: Producción de celulosa en función del tiempo para diferentes concentraciones iniciales de glucosa (26)

Este estudio se basó en aumentar la concentración de glucosa para observar la variación de la producción de celulosa tal como se observa en Figura 22. Los autores afirman que los mejores resultados se obtuvieron con una concentración inicial de 50 y 200 g/L, ya que la etapa inicial se caracteriza por una alta transformación de glucosa y baja conversión a celulosa pero a tiempos mayores hay un aprovechamiento de los intermediarios para formar una gran cantidad de celulosa. Para bajas concentraciones, la formación de intermediarios es muy baja por lo que la glucosa se transforma directamente en celulosa teniendo un rendimiento menor (26).

En 2015, un estudio realizado en la India por diversos colaboradores se utilizó la bacteria *Gluconacetobacter xylinus* tipo MTCC7795 para el estudio de la cinética de la producción de celulosa. Se realizó con un cultivo mixto basado en 2% glucosa, 0,5% extracto de levadura, 0,5% de peptona, 0,27% de fosfato disódico y 0,15% de ácido cítrico. El pH se mantuvo en 6,0 con usando 1M de HCl y se fermentó en 100 ml con una suspensión al 2% de células por 24h. La concentración de celulosa se determinó a través de la densidad óptica a 600 nm (OD600) y se observó la cinética de la reacción con dos cultivos estáticos a 30°C y 37°C así como dos cultivos agitados a 120 rpm a 30°C y 37°C. Los resultados de este estudio se observan en la

Tabla 8 donde observamos que la tasa más alta de producción es en un cultivo estático a 30°C mientras que la tasa más baja fue reportada a 37°C en cultivo estático (27).

Condición de cultivo	Tasa específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )
Estática 37°C	0,080
Estática 30°C	0,520
Agitada 37°C	0,182
Agitada 30°C	0,472

Tabla 8: Cinética de crecimiento de *G. xylinus* en diferentes condiciones de cultivo (27)

En 2014 se publicó un estudio en la revista especializada Applied Microbiology and Biotechnology que evaluó la producción de CB por *G. xylinus* utilizando desechos industriales como fruta podrida. Se utilizó un cultivo de 20 g/L de glucosa, 5 g/L de peptona, 5 g/L de extracto de levadura, 2,79 g/L de ácido cítrico monohidrato, 1,15 g/L de fruta podrida. Ésta última incluía ciruela, uvas verdes, piña y manzana las cuales se obtuvieron a través de 250 g de fruta licuada con 400 mL de agua desionizada con posterior filtrado y centrifuga por 20 minutos. Así mismo, se esterilizó la mezcla obtenida a 121°C por 30 minutos y se almacenó a 4°C con una estabilización de pH a 6,0 (28).

Durante ésta investigación, se utilizaron medios estáticos a 30°C por 96 horas y un pH inicial de 6,0. Una vez concluido el tiempo de producción se recolectó la celulosa bacteriana y fue lavada con agua destilada y con NaOH [1M] a 60°C por 90 minutos para remover los residuos de células remanentes. Posteriormente se realizó otro lavado con agua destilada y un secado a 50°C por 24 horas, es decir, el proceso tuvo una duración total de aproximadamente 122 horas. Se obtuvo el mejor resultado con un ratio de carbono/nitrógeno de 57,6 en el medio de cultivo con un rendimiento de 60 g/L con una cinética de 0,63  $\text{h}^{-1}$  (28).

En el mismo año, 2014, Matsuoka et al. de Japón, demostraron que emplear un medio de cultivo sintético con lactato tiene resultados muy similares que utilizar líquido de maíz fermentado. En este estudio se utilizó *G. xylinus* aislada de fruta podrida, en un medio de cultivo con un 4% de fructosa, peptona y se agregó un 0,15% de lactato en un fermentador agitado. Las bacterias se cultivaron a 28°C por 72 horas, la suspensión posteriormente se filtró a través de una gasa de algodón y se inoculó con 107 ml del cultivo mencionado con 5 ml de 10% en celulasa. En la Figura 23 se observa que la producción de celulosa bacteriana aumenta en las primeras horas de cultivo al agregar lactato al cultivo y, que según Matsuoka et al., aumenta 4 o 5 veces (29).

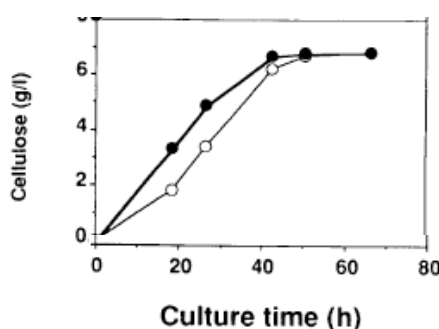


Figura 23: Efectos de lactato en la producción de celulosa en una jarra de fermentación (29)



Una investigación muy interesante hecha por S. O. Bae y M. Shoda en 2004 donde al agregar LMF con molasa al cultivo bacteriano con tratamiento previo de ácido sulfúrico se encontró un aumento de la tasa de producción en un 76% y se duplicó la tasa de crecimiento. Se utilizó la bacteria *G. xylinus* con una suspensión celular a 30°C estática por 72h con 100 ml de licor de maíz fermentado con fructosa. Esta suspensión tenía como composición: 20 ml/L de LMF, 40 g/L de glucosa y 10 ml/L de solución vitamínica. Se extrajo 15 ml de esta suspensión celular y se inoculó con 150 ml de LMF y fructosa en un agitador rotativo de 185 mm de diámetro y 390 mm de altura, a 30°C y 180 rpm por 24 horas. Para poder homogenizar el producto obtenido se centrifugó a 10.000 rpm durante un minuto y se inoculó posteriormente en 4,5 litros de LMF con molasa en un reactor con volumen de trabajo de 5 L, una temperatura de 30°C y un pH de 5,0 estabilizado con NaOH [4M] y H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [4M]. En este reactor hicieron circular aire filtrado a 2 L/min y se mantuvo una concentración de oxígeno disuelto al 30% (30).

El tratamiento previo con ácido sulfúrico al LMF con molasa cambió la composición de sacarosa, fructosa y glucosa y por este motivo afectó a la producción de CB. Anterior al tratamiento con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, el licor de maíz fermentado contenía 16 g/L de fructosa y 15 g/L de glucosa, posterior al tratamiento la composición era de 56 g/L y 48 g/L respectivamente. En la Figura 24, se ilustra los resultados del cultivo antes y después del tratamiento dicho. Así mismo, en la Tabla 9 se puede observar que la tasa de producción aumenta de 0,042 a 0,074 g·l<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> con un tratamiento de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, lo que representa un 76% y la concentración de celulosa bacteriana casi se llegó a duplicar (30).

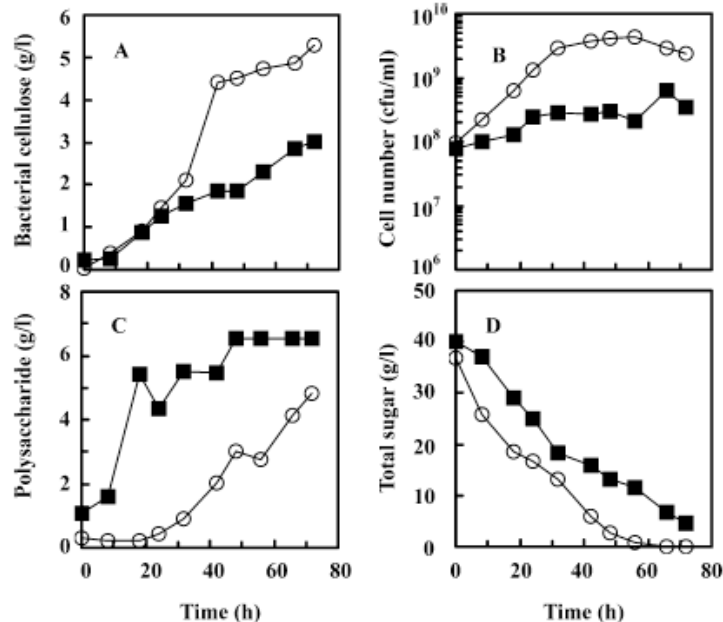


Figura 24: Cultivo de *G. xylinus* para la producción de CB.

○ con tratamiento de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; ■ solución con melaza

Solución de Melaza	Máxima concentración de CB (g/L)	Tasa de producción (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )
Sin tratamiento	3,01	0,042
Tratamiento de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,30	0,074

Tabla 9: Producción de CB y crecimiento celular de *G. xylinus* en solución melaza y melaza con tratamiento al calor con ácido sulfúrico con concentración inicial de glucosa de 40 g/L (30)

Otro aditivo con resultados positivos es el alginato de sodio (NaAlg) que en cultivos de celulosa bacteriana también ha mostrado mejores significativas ya que aumenta el rendimiento de producción tal como lo realizó Zhou, Sun, et al. en 2007 tanto en un reactor de tanque agitado como en matraces de agitación. Utilizaron como *bacteria G. xylinus* NUST4,1 aislada de fuentes naturales, se preparó un inóculo al 2% de glucosa, 0,6% LMF sólido y un medio de cultivo al 1,8% de glucosa, 2,1% sacarosa y 2% de LMF sólido. El alginato de sodio (NaAlg) fue de grado químico y se alteraron las concentraciones para evaluar el efecto que realiza sobre la producción, cabe resaltar que al tanque agitado se le agregó un 0,02% de anti-espumante (31).

Para la realización de los experimentos de Zhou, Sun, et al. se realizó un precultivo y un cultivo con una duración de 6 días. El precultivo consistió en agregar 1 mL de suspensión celular a 100 mL de medio de alimento en un frasco cónico de 500 mL y agitarlo a 200 rpm, a 29°C por 12h. El cultivo con duración de 5 días radicó en introducir la suspensión resultante a un frasco de 250 ml con 45 ml de medio de cultivo descrito anteriormente a 29°C, una velocidad de agitación de 150 rpm y con un flujo de aire de 3 L/min. A continuación, cuando se obtuvo el brote de celulosa, se lavó con una solución al 4% de NaOH a 80°C durante 2 horas para solubilizar impurezas y células enganchadas para posteriormente realizar un lavado con agua hasta neutralizar el pH. Una vez purificada la CB se secó a 80°C para poder ser pesada y evaluada (31).

Los resultados de Zhou, Sun, et al. fueron positivos para la introducción de alginato de sodio en pequeñas proporciones en los matraces agitados. En este caso se realizó con y sin NaAlg variando su concentración entre 0 y 0,1%, obteniendo que la concentración óptima es de 0,04% ya que a mayores concentraciones aumenta la viscosidad y es contraproducente para la producción de CB. En el grupo de control sin alginato de sodio se obtuvo una producción de 3,7 g/L de celulosa mientras que con una concentración óptima de NaAlg se obtuvo 6,0 g/L, tal como se observa en la Figura 25. Así mismo el rendimiento terminal de la celulosa fue de 27% para la presencia de alginato de sodio mientras que para el grupo de control solamente fue del 24% (31).



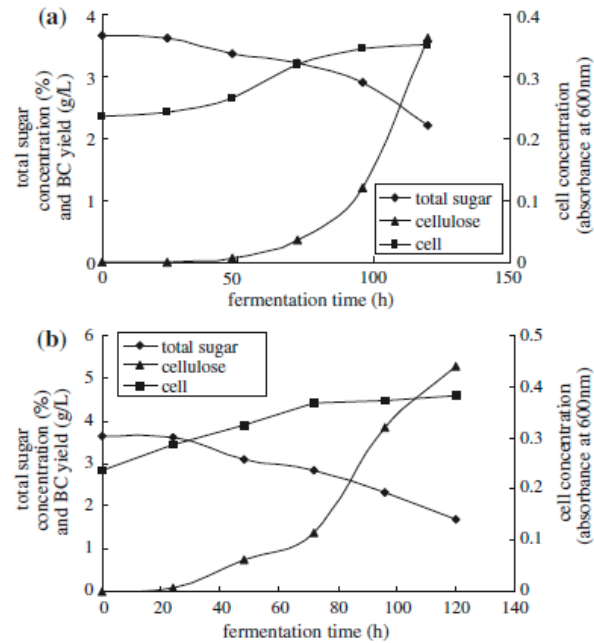


Figura 25: Dinámica de síntesis de CB por *G. xylinus* en matraz de agitación (a) 0% y (b) 0,04% NaAlg (31)

En el caso del reactor de tanque agitado no se obtuvieron rendimientos de celulosa tan altos como en los matraces de agitación pero la proporción de los cambios de producción de celulosa fueron similares al caso anterior. La relación de la concentración de azúcar y concentración celular durante la fermentación se observan en la Figura 26 con presencia de alginato de sodio al 0,04%. Otro dato de interés fue que en el grupo de control se presentaron irregularidades grumosas de diferentes tamaños, cosa que no se presentó en presencia de NaAlg. El rendimiento máximo obtenido fue de 1,89 g/L en 60 horas con 0,04% de NaAlg contra un 1,09 g/L en el grupo de control, aumentando así un 73% su rendimiento, sin embargo la producción fue considerablemente menor que en matraces de agitación (31).

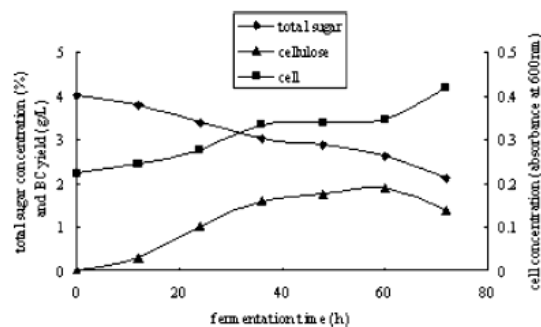


Figura 26: Dinámica de síntesis de CB en un reactor de tanque agitado con 0.04% de NaAlg (31)

En el mismo año, 2007, Kongruang en Tailandia realizó un estudio con tres diferentes subespecies de *G. xylinus* con zumo de piña y coco esterilizado y madurado como medio de cultivo. Se analizó el rendimiento, la cinética de reacción y se escaló a 5000 ml obteniendo una producción máxima de celulosa de 576,66 g/L. Las tres subespecies estudiadas fueron *G. xylinus* TISTR 998, 975 y 873 en un medio estático con sumo de piña y coco con 1% de



extracto de levadura y 14 ml de etanol al 95%, a 30°C, un pH de 4,75 y un tiempo de recolección de dos semanas. La CB recolectada se lavó con agua y fueron sumergidas posteriormente por dos días en una solución 1M de NaOH a 30°C. Posteriormente se sumergió en agua destilada con 0,02% de NaN<sub>3</sub> (Azida de sodio) para reducir la contaminación microbiana y se almacenó a 4°C (32).

Kongruang argumentó que la bacteria *G. xylinum* TISTR 998 tenía una eficacia que duplicaba el valor de tasa de formación que el resto de las subespecies ya que metaboliza mejor la sacarosa, glucosa y fructosa del zumo de coco. En la Tabla 10 se resumen la tasa de crecimiento en g/L·h, tasa de crecimiento específica en h<sup>-1</sup> y la cantidad de celulosa bacteriana en g/L donde se concluye que para el sumo de piña el mejor productor es la TISTR 998 y para el sumo de coco la TISTR 893 con una producción de 576,66 g/L (32).

Sustrato	Bacteria	CB (g/L)	Tasa formación (g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	Cinética (h <sup>-1</sup> )
<b>Piña</b>	<b>998</b>	<b>553</b>	530,42	0,5
	893	453	191,20	0,5
	975	243	155,74	0,5
<b>Coco</b>	998	520	213,60	0,021
	<b>893</b>	<b>576,66</b>	410,24	0,022
	975	546	434,38	0,021

Tabla 10: Parámetros del crecimiento cinético durante la fermentación estática de *G. xylinus* en sumo de coco y piña a 30°C durante 2 semanas.

Más aún en investigaciones sobre la celulosa bacteriana, en el año 2002 en Polonia se estudiaron diferentes factores que afectan al rendimiento de producción y en las propiedades de este producto. Krystynowicz et al. demostraron que un cultivo estacionario proporciona un mejor módulo de Young que un fermentador de discos rotatorios. Así mismo, corroboraron la relación del número de discos en un fermentador y rendimiento, el efecto de cambiar la concentración inicial de glucosa, la velocidad de rotación en un cultivo agitado y la relación superficie/volumen en un cultivo estático con la eficiencia de producción (33).

Para este estudio, se utilizó como medio el llamado Schramm & Hestrin con un pH establecido a 5,7 y como bacteria *G. xylinus* E<sub>25</sub>. El cultivo en cuestión contiene glucosa y extracto de levadura como fuente de carbono y de nitrógeno, respectivamente. La pre-inoculación se realizó en un cultivo estático a 30°C por 48-64h posteriormente de lo obtenido se introdujeron 10ml en un vaso de 500 ml con 100 ml del medio de Schramm & Hestrin por dos semanas a 30°C. Para todos los cultivos se purificó la celulosa obtenida hirviendo a 1% de NaOH por 2h con 5% de ácido acético (33).

Volumen medio (cm <sup>3</sup> )	Superficie (cm <sup>2</sup> )	Superficie/Volumen (cm <sup>-1</sup> )	Rendimiento CB (g/l)
<b>200</b>	425	2,13	2,7
<b>400</b>		1,06	3,1
<b>600</b>		<b>0,71</b>	<b>3,5</b>
<b>800</b>		0,53	3,0
<b>1200</b>		0,35	2,4

Tabla 11: Influencia del coeficiente S/V en el rendimiento de producción de celulosa bacteriana (33)





Las conclusiones a las que se llegaron en esta investigación son muy interesantes debido a que son muchos los factores involucrados en la producción de la celulosa bacteriana que se pueden modificar para obtener un mejor rendimiento o mejores propiedades. Una de las conclusiones que citaron estos autores fue que en un cultivo estático, es que la relación superficie/volumen es un factor que influye en la eficiencia del proceso. En la Tabla 11 se muestra que en este estudio la relación óptima es de  $0,71 \text{ cm}^{-1}$  donde el rendimiento de producción es  $3,5 \text{ g/L}$  y donde la superficie se mantuvo constante a  $425 \text{ cm}^2$  (33).

Muestra	Módulo de Young [GPa]	Tensión de rotura de rotura [MPa]
Estacionario	2,7	92,0
RDF	0,3	22,9

Tabla 12: Propiedades físicas de CB producida en diferentes condiciones (33) [RDF] Rotating Disc Fermentor

Por otro lado, estos autores afirman que en un cultivo estático el módulo de Young es mucho mayor comparado con un fermentador de discos rotatorios así como la resistencia a tracción como se ilustra en la Tabla 12. En cuanto a la velocidad de rotación de los discos rotatorios en el fermentador, se observa en la Tabla 13 que a una velocidad lenta se obtienen mejores resultados contrariamente al efecto de número de discos que, a mayor número se obtienen mejores rendimientos (33).

Velocidad de rotación (rpm)	Rendimiento CB (g/l)	Número de discos	Rendimiento CB (g/l)
4	2,82	11	2,3
6	2,10	12	2,65
8	1,89	18	3,0
10	1,70	21	3,1
12	1,72	24	3,3
16	1,78		

Tabla 13: Efecto en velocidad de rotación y número de discos (área superficial) en síntesis de CB (33)

Finalmente, se estudió el efecto que tiene al variar la concentración de glucosa inicial con el rendimiento de producción de la CB en fermentador de discos giratorios. Krystynowicz et al. encontraron que a menor concentración inicial de glucosa era más efectiva la síntesis de celulosa y se obtuvo mejor rendimiento. En la Figura 27 se demuestra que, mientras que la producción más alta de CB con membranas más gruesas se obtuvo a una concentración de  $20 \text{ g/L}$  de glucosa; la mayor masa seca de celulosa coincidió con una concentración inicial de  $5 \text{ g/L}$ , teniendo una mejor eficiencia (33).

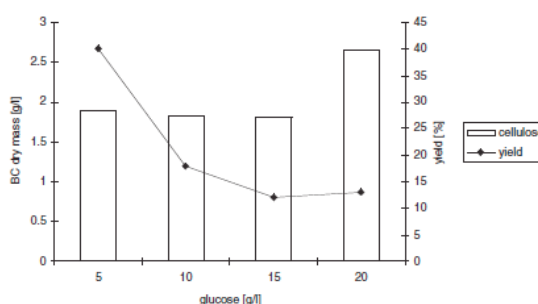


Figura 27: Efecto de la diferente concentración inicial de glucosa en síntesis de CB (33)

Por lo que se refiere a reactores utilizados para la producción de celulosa bacteriana, Cheng et al. en 2009 también estudiaron los efectos en propiedades mecánicas y rendimientos al utilizar un tanque con un biofilm específico hecho con un soporte de composite de plástico. En primer lugar, de trece composites con composiciones diferentes se analizó cuál de ellos tenía mejores resultados para un cultivo estático para su posterior trabajo con el reactor. El estudio se realizó con la bacteria *G. xylinus* ATCC 700178 con un medio de cultivo de LMF con una composición de 50 g/L de fructosa, 20 ml/L de licor de maíz fermentado y un aditivo de alginato de sodio tal como se mencionó en la investigación de Zhou (34).

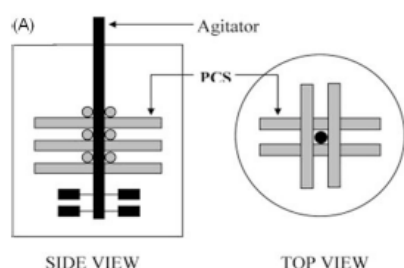


Figura 28: : Diagrama del reactor con biofilm. (PCS. Plastic Composite Support) (34)

El reactor en cuestión es un *Bioflo 3000 1,25 L* con un volumen de trabajo de 1 litro, una agitación de 100 rpm, una temperatura de 30°C, un pH inicial de 5,0, una duración de 120h de fermentación y un acomodo de doce tubos de soporte de composite plástico como se muestra en Figura 28. Una vez acabado el tiempo de cultivo, con el objetivo de hidrolizar la CB obtenida, se introduce en 90 ml de una solución tampón al 0,1M de acetato de potasio con un pH de 5,0 con 10 ml de 20% celulosa, a una temperatura de 50°C con agitación a 100 rpm por una hora. Por último, se purificó por triplicado a 80°C en solución con 0,1M de NaOH por 30 minutos y finalmente se secó en un horno a la misma temperatura (34).

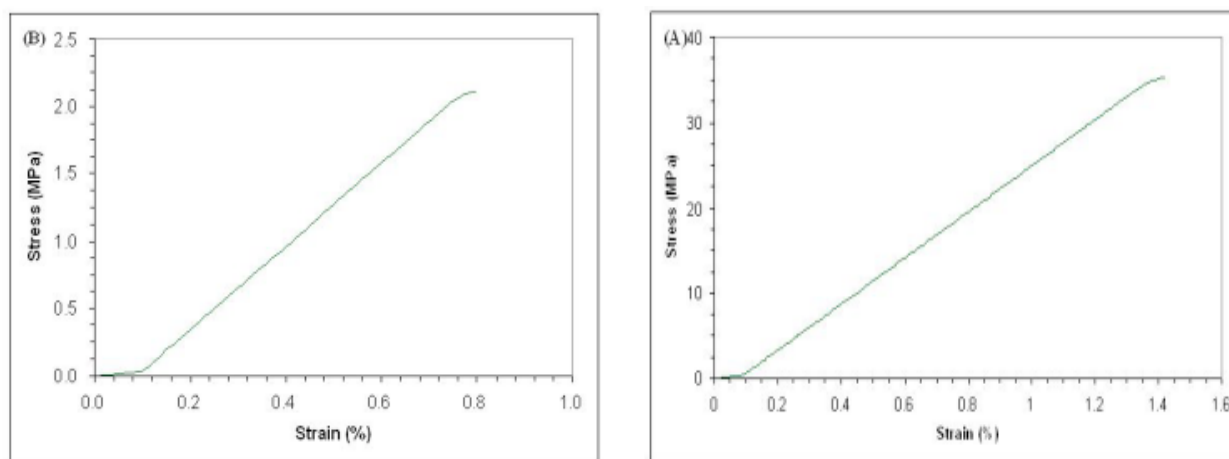


Figura 29: Diagramas de tensión/deformación de los resultados de las pruebas de tracción para (1) prueba de control agitada y (2) reactor con soporte de composite plástico (34)



Para observar resultados, Cheng et al. realizaron un grupo de control con un cultivo agitado con el mismo medio y lo compararon con la celulosa obtenida del reactor de biofilm con las condiciones antes mencionadas. Con respecto a las propiedades mecánicas, se realizó la prueba de tracción para ambos grupos y se obtuvo que la celulosa obtenida con el reactor exhibió una deformación más elástica, alrededor de un 1,4% mientras en el grupo de control solamente mostró un 0,8% de alargamiento. Esto demuestra una resistencia mecánica de la celulosa bacteriana superior en un cultivo obtenido con un reactor de biofilm que uno con agitación simple (34). La prueba de tracción se ilustra en la Figura 29.



Figura 30: Crecimiento de celulosa en el eje del reactor después de 120h de cultivo (34)

En cuanto a la eficiencia que tiene este método, únicamente se hizo una extracción de la celulosa obtenida del reactor, la cual se observa en la Figura 30 para purificar y pesarla. Con un reactor de biofilm con el composite de plástico seleccionado, se obtuvo una producción de celulosa bacteriana de 7,05 g/L siendo 2,5 veces mayor a la producción obtenida a través de un reactor en suspensión de células que fue de 2,82 g/L. Los autores afirman que esta diferencia se debe a la mayor densidad de biomasa acumulada en el soporte de composite y relación que mantiene la densidad celular con la producción de celulosa bacteriana (34).

Los autores Zahan et al. en 2014 realizaron un artículo donde exponen sus conclusiones acerca de cuáles son las mejores condiciones para la producción de CB en un reactor de disco giratorio. Las variables estudiadas fueron la concentración de inóculo, pH, velocidad de rotación del disco rotatorio y días de cultivo para poder encontrar los valores óptimos para mejorar la producción de celulosa. Así mismo, expresaron una vía de obtención que beneficia a los programas de desechos orgánicos ya que utilizan como medio de cultivo desperdicios de piña (35).

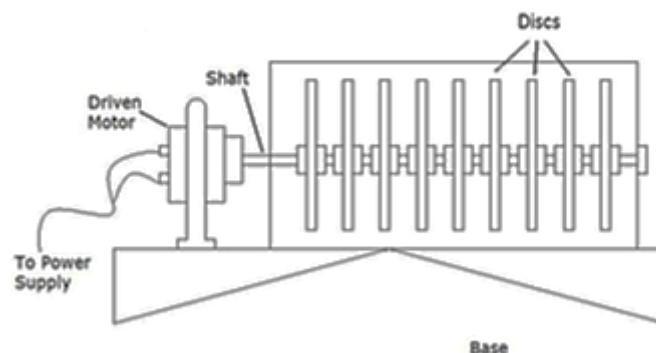


Figura 31: Diagrama esquemático de un reactor de disco giratorio

Los residuos de piña fueron de interés por estos autores ya que es una buena fuente de nutrientes para los microorganismos por sus altos niveles de carbono además de ser un deshecho producido en grandes cantidades por la industria. El reactor que fue utilizado se ilustra en la Figura 31 y sus especificaciones se muestran en la Tabla 14. El inóculo fue preparado con 400 ml de desperdicio de piña previamente esterilizado con 6 g/L de extracto de levadura y 1,49 g/L de bactopetona ajustado a un pH de 5,0 con una solución 2M de NaOH. Posteriormente se esterilizó a 121°C por 15 min, se dejó enfriar hasta 28°C para poder agregar 10 ml de la solución con *G. xylinus*. El medio de cultivo tuvo la misma preparación pero cambiando el volumen del desperdicio de piña por 4 litros y sin agregar la solución bacteriana (35).

Parámetro	Especificación
<b>Diámetro del disco</b>	13 cm
<b>Inmersión de discos</b>	30%
<b>Área total de discos</b>	2124 cm <sup>2</sup>
<b>Volumen total</b>	10000 cm <sup>3</sup>
<b>Volumen de trabajo</b>	4000 cm <sup>3</sup>
<b>Número de discos</b>	8

Tabla 14: Especificaciones del RBC utilizado en el estudio de Zahan et al. (35)

Tanto el medio de cultivo como el inóculo se vacían en el reactor y las variables de velocidad de rotación de los discos, pH, periodo de cultivo y concentración de inóculo se alteraron para observar el efecto. La primera variable se estudió en 5, 7, 9 y 12 rpm; el pH fue variado en los valores entre 3,5 y 7,0; la concentración de inóculo varió entre 3, 5, 10 y 20%; y finalmente el período de cultivo se trabajó en 3, 4, 5 y 6 días. De estas variables, las óptimas obtenidas después de un análisis estadístico fueron 7 rpm, pH 5,5, 10% (v/v) de inóculo y 4 días de cultivo, la masa seca de CB producida fue de 28,30 gramos, siendo seis veces mayor a la producción mínima de 4,70 g. La producción mínima se obtuvo bajo las mismas condiciones que la producción máxima únicamente variando el pH de 5,0 a 3,5 dando como conclusión que un pH adecuado es estrictamente necesario para tener una producción óptima. Los resultados que arrojó la investigación se muestran en la Tabla 15 (35).



Velocidad de rotación (rpm)	pH	Días de cultivo (días)	Concentración de inóculo (% v/v)	Masa de celulosa seca (g)
5	5,5	4	10	20,75
7	5,5	4	10	20,75
9	5,5	4	10	20,75
12	5,5	4	10	10,75
7	3,5	4	10	4,70
7	<u>5,0</u>	<u>4</u>	<u>10</u>	<u>28,30</u>
7	5,5	4	10	22,80
7	6,0	4	10	18,10
7	5,0	3	10	23,34
7	5,0	5	10	22,29
7	5,0	6	10	21,09
7	5,0	4	10	20,34
7	5,0	4	3	18,67
7	5,0	4	5	19,31
7	5,0	4	20	18,70

Tabla 15: Resultados del proceso de modificación de variables para un reactor RDR (35)

Por lo que se refiere a producciones de celulosa bacteriana en grandes dimensiones, diversos autores desde 1988 han experimentado con grandes volúmenes de reactores para evaluar su eficiencia y viabilidad económica para la obtención de un producto comercial. En el caso de Laboureur, realizó la producción en un fermentador de 300 litros por 45h, 30°C, 60 rpm, aireación de 0,6 volumen por volumen por minuto (v.m.m.) y se obtuvo 10 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> de celulosa bacteriana. Ben-Bassat et al. en 1989 utilizó un fermentador de 14 litros, un medio de cultivo de LMF con glucosa al 2%, una velocidad de 900 rpm, oxígeno disuelto al 30% y obtuvo 5,1 g/L·d de celulosa. En el año 2000, se obtuvo una producción de 8 g/L en 67 h por Chao et al. con un reactor tipo *airlift* con bucle interno de 50 litros con una aireación enriquecida con oxígeno. Como se ha mencionado anteriormente, preparar un inóculo con la densidad bacteriana apropiada para grandes volúmenes de fermentadores es un problema ya que las células quedan atrapadas en la celulosa por lo que es más eficiente utilizar reactores con volúmenes reducidos (8).

Por último, en uno de los estudios más recientes en 2009 se creó el concepto *HoLiR* por Kralisch et al. que proviene de la abreviación "*Horizontal Lift Reactor*". Este reactor se caracteriza por una longitud y espesor seleccionable, así como una homogeneidad comparable a la que se obtiene en un cultivo estático. El estudio hecho por Toda et al. en 1994 fue de gran aportación ya que reportó un incremento del rendimiento de producción utilizando un cultivo continuo con fuentes de carbono. A partir de esto y de la creciente demanda de una producción automatizada de celulosa bacteriana de buena calidad, Kralisch et al. decidieron estudiar la viabilidad de realizar una planta piloto (36).

La investigación consistió en el medio de cultivo de Hestrin & Schramm antes mencionado, estabilizado a un pH de 6,0, esterilizado a 121°C por 20 min, un inóculo con el mismo contenido y la bacteria *G. xylinus* DSM14666. Primero se realizó a una escala de laboratorio con un volumen de reactor de 20 L y posteriormente, a un diseño y construcción de una escala piloto con un volumen de 180 litros. La escala laboratorio y la CB producida en este caso se observa en la

Figura 32. La operación de extracción se realizaba cuando la celulosa tenía la altura deseada y se efectuaba una limpieza con hidróxido de sodio hirviendo 0,1M por 30 min y posteriormente con agua desionizada. El secado se realizaba mediante dos vías, vía fría a  $-50^{\circ}\text{C}$ , 0,05 mbar por 48h utilizando el modelo *Freeze-drying Alpha 1-2* y vía caliente en prensado a  $120^{\circ}\text{C}$  utilizando el modelo *Yellow press 4050* (36).



Figura 32: HoLiR- escala laboratorio (izquierda), lámina obtenida de CB (derecha) (36)

La primera experimentación a escala laboratorio, se tenía una dosis continua de medio de cultivo y la extracción era gradual con un dispositivo extractor. Realizarlo de esta forma tenía dos ventajas, la primera era que la longitud y la altura de la celulosa era completamente graduable y la segunda era que la celulosa tenía la misma estructura homogénea y de red tridimensional imperturbable que en un cultivo estático. Este dato se confirmó al mirar al microscopio la estructura de la celulosa extraída mediante este método y una muestra extraída mediante método estático. En la Figura 33 se observa la mínima diferencia de estructura entre ambas muestras. Posterior a la obtención de las láminas continuas de celulosa, se lavan en un sistema semi-continuo de rodillos o transportadores de cinta mediante los agentes limpiadores antes mencionados y por último, se subdivide (36).

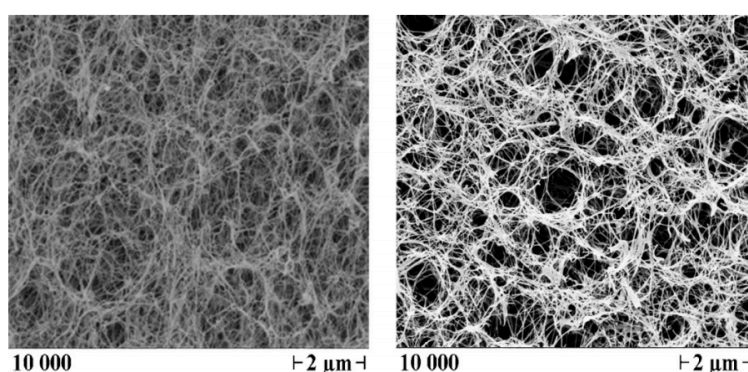


Figura 33: Gráficos obtenidos mediante microscopio electrónico de barrido. CB obtenida mediante HoLiR (izquierda) y CB obtenida mediante matraz Erlenmeyer (estático) (derecha) (36)

Después de una prueba exitosa del concepto mediante la planta experimental escala laboratorio, la construcción de la planta piloto se inició mediante la transferencia de las características





esenciales de la planta descritas con anterioridad. Para este fin, las dimensiones del aparato de cultivo se ampliaron a un volumen de 180 litros. En la Figura 34 se ilustra el dibujo ingenieril de la planta piloto y en la Figura 35 se observa la planta después de la construcción (36).

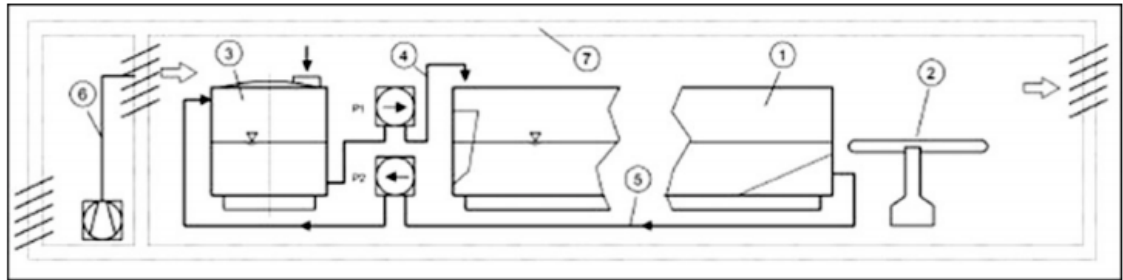


Figura 34: Dibujo ingenieril de la planta, 1) Dispositivo de cultivo, 2) Dispositivo extractor, 3) Tanque contenedor del medio de cultivo, 4) Alimentación del medio de cultivo, 5) Tubo de salida para el medio de cultivo consumido, 6) Alimentación de aire, 7) Alojamiento.

El proceso de generación de CB dentro de esta planta piloto se puede subdividir en cinco etapas observadas en la Figura 35. En la primera etapa, posterior a la inoculación, se genera la celulosa bacteriana y se hace visible en forma de un prepolímero mecánicamente inestable con una red de fibra de malla ancha. Durante la etapa número dos, se obtiene un material de celulosa plana con una superficie uniforme con un crecimiento de grosor de 0,5-1,5 mm por día después de que la superficie del prepolímero esté cerrada. El medio de cultivo agotado se deja salir para que la alimentación inicial por lotes se cambie a un cultivo de movimiento lento y de colecta continua entre 7 y 10 días. En la etapa número tres, en la superficie libre del medio de cultivo se genera nueva celulosa y durante su crecimiento, las láminas producidas se transportan de forma continua a través del biorreactor y el tamaño puede ser ajustado a la velocidad de transporte. Posteriormente en la etapa cuatro el material se recoge mediante transportadores de cinta y por último, la etapa cinco consiste en la limpieza del producto mediante los agentes dichos (37).

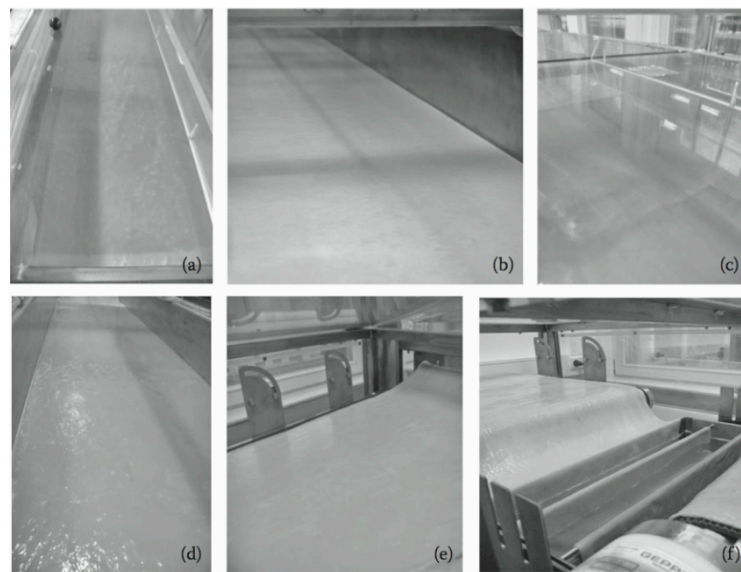


Figura 35: Etapas de cultivo de CB en planta piloto HoLiR (15)



En la Figura 35 se observan las diferentes etapas de la producción de la planta piloto *HoLiR*. La primera etapa de crecimiento se observa en la imagen (a), la segunda etapa cuando ya existe lámina de celulosa se percibe en la imagen (b), en la ilustración (c) y (d) se ve el cultivo continuo y la generación de nueva CB en la superficie libre. La etapa 4 de transporte continuo se representa en la imagen (e) y finalmente la etapa de limpieza se representa en la fotografía (f) (15).

Una vez que este proceso da comienzo, es decir después de las etapas 1 y 2, el bioproceso se mantiene estable por varios meses sin ninguna interrupción, intervención manual o apagada. Esto se debe a que el aire y el medio de cultivo se alimentan continuamente del aparato y por lo tanto se mantienen las condiciones de cultivo en estado estacionario (15). Los autores intentaron realizar un estudio económico muy subjetivo tomando en cuenta costes eléctricos y de personal y concluyeron que una planta reduce un 78% los costes de producción en comparación de un cultivo de CB en condiciones estáticas dentro de un matraz de Erlenmeyer (36).



### 3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es realizar el diseño de una planta piloto para producir celulosa bacteriana a partir de la fermentación de la bacteria *Glucoacetobacter xylinus*. Se contemplará los aspectos más relevantes como la seguridad, eficiencia, rentabilidad y minimización de costos.

Para el desempeño del trabajo se cumplirán los siguientes objetivos particulares:

- Presentación de un plan general de una planta de obtención de CB para una producción de 1350 kg/año
- Descripción de las operaciones básicas involucradas
- Proposición de un pre-diseño del fermentador
- Presentación de un sistema de separación y purificación de la celulosa bacteriana
- Proposición de un plan de operaciones para la seguridad de la planta
- Análisis económico de la inversión, costos de producción y viabilidad de la planta
- Estudio del impacto ambiental

## 4. Materiales

Para el diseño de la planta se tuvieron en cuenta diferentes objetivos que son los mencionados a continuación:

1. Alto rendimiento de producción de celulosa bacteriana
2. Optimización de recursos para aminorar los costes para diseñar una planta viable y eficiente
3. Obtención de 1.350 kg/año de celulosa bacteriana
4. Encontrar un balance con el medio ambiente
5. Encontrar un cultivo óptimo el cual aumente la producción de CB

## 5. Resultados

### 5.1. Descripción del proceso

El proceso de obtención de la celulosa bacteriana consiste en cuatro fases, preparación del inóculo, preparación del medio de cultivo, fermentación y procesado. Las primeras dos se pueden realizar paralelamente ya que son independientes mientras que las siguientes dos son seriadas. La preparación del inóculo es realizar la mezcla donde se encuentra presente la bacteria la cual únicamente representa el 10% del volumen total del reactor. La preparación del medio de cultivo es realizar una mezcla que representa el volumen restante del reactor con los mismos componentes que el inóculo pero sin presencia microbiológica. Una vez realizadas estas dos etapas, ambas mezclas se introducen en el reactor con ciertas condiciones para producir una fermentación este proceso puede durar entre 1 y 5 días. La última etapa es el procesado del producto del reactor donde es necesario realizar dos lavados con agua destilada, una neutralización de la bacteria y un secado. Todo el proceso descrito se observa en la Figura 36 .

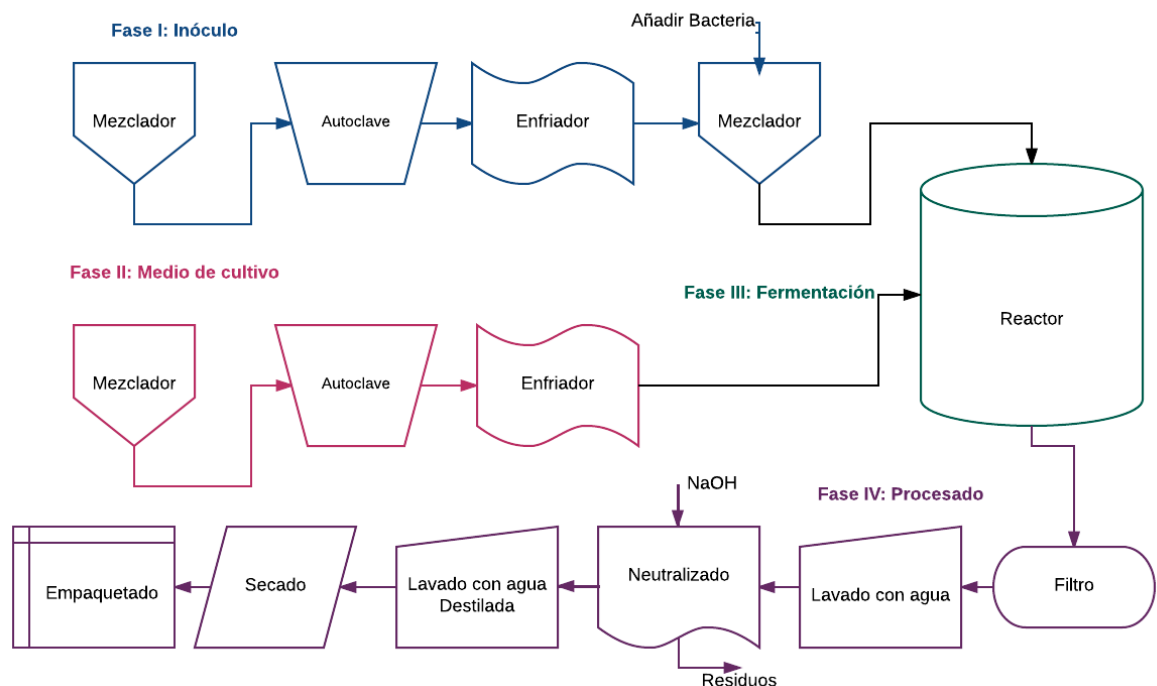


Figura 36: Diagrama de bloques de proceso de obtención de celulosa bacteriana

El proceso de fermentación para la obtención de celulosa bacteriana puede ser mediante vía agitada, estática o combinado. La primera vía mejora la difusión del nutriente al agitar el medio de cultivo e incrementa la solubilidad del oxígeno y debido a esto, las investigaciones de producción a gran escala de CB tienen tendencia hacia cultivos agitados. Así mismo, un cultivo agitado reduce hasta 10 veces el tiempo de cultivo comparado con los estáticos por el

contrario demasiada aireación es contraproducente debido a que se producen mutantes no productores de celulosa (15).

### Vía Agitada

Los reactores utilizados en vía agitada son tanques de removido, columnas de burbuja, reactor *airlift* y reactor *gaslift*. El tanque de removido y el *airlift*, ilustrados en la Figura 37, son los utilizados más comúnmente en fermentaciones biológicas. Este último mejora considerablemente la circulación y por lo tanto, la transferencia de oxígeno por manipulación de la aireación y la velocidad de agitación. Para una alta tasa de producción de celulosa bacteriana se requiere una transferencia de oxígeno alta lo cual lo convierte en un factor importante aunque eleve el coste energético (15).

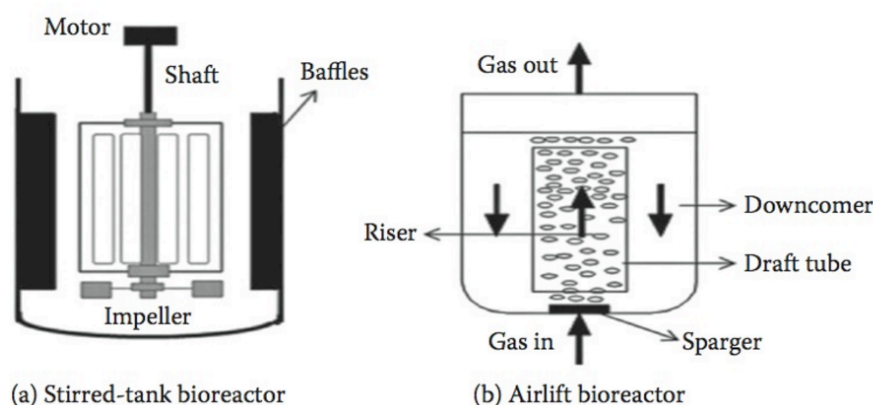


Figura 37: Biorreactores utilizados para producir CB (15)

Así mismo, la vía agitada puede ser agitada o removida y la diferencia entre estas dos consiste en que la última puede ser producida por transferencia de gas o impulsores. Las columnas de burbuja y fermentadores de removido utilizan este efecto pero el fermentador proporciona una mayor transferencia de oxígeno por manipulación de la aireación y la velocidad de agitación (15). No obstante, un estudio realizado por Watanabe et al. en 1997, comprueba que aunque mejoran las condiciones esenciales de la celulosa con una vía agitada en comparación de la estática, las columnas de burbuja y el tanque de removido fueron desfavorables para la producción de CB (22).

Como se menciona anteriormente, investigaciones de Zhou et al. en 2007 compararon la vía agitada con un reactor de removido con la adición de alginato de sodio al medio. Al añadir un 0,04% de esta sustancia a matraces de agitación encontraron que se producía 6,0 g/L de celulosa y la conversión de glucosa a celulosa fue de 27%, mientras que en la vía estática únicamente se produjo 3,0 g/L y 24%, respectivamente. En el caso del tanque de removido, la adición de NaAlg influyó en la morfología de la CB ya que en lugar de ser grumos irregulares y masas fibrosas enredadas en las partes internas, se obtuvo una masa discreta dispersa en el medio. Los autores llegaron a la conclusión que el alginato de sodio impide la formación de grandes cúmulos de celulosa y mejora el rendimiento de producción (31).

En el caso de Chao et. al en el año 2000, utilizaron exitosamente un reactor *airlift* con bucle interno de 50 litros que se ilustra en la Figura 38. Observaron que se incrementó la transferencia de oxígeno y consecuentemente la producción de CB que llegó a un valor de 0,0567 g/L·h. Posteriormente, utilizaron un gas interno enriquecido con oxígeno en el sistema donde obtuvieron un rendimiento de 0,116 g/L·h, Chao et al. afirman que el valor es el doble que un sistema típico de aireación debido a la alta concentración de oxígeno disuelto y la baja fuerza de corte en el reactor *airlift*, ya que éste tiene un efecto negativo en la producción de CB. Para poder llegar a los 8 g/L mencionado anteriormente se realizó una adición de un polisacárido soluble en agua (15).

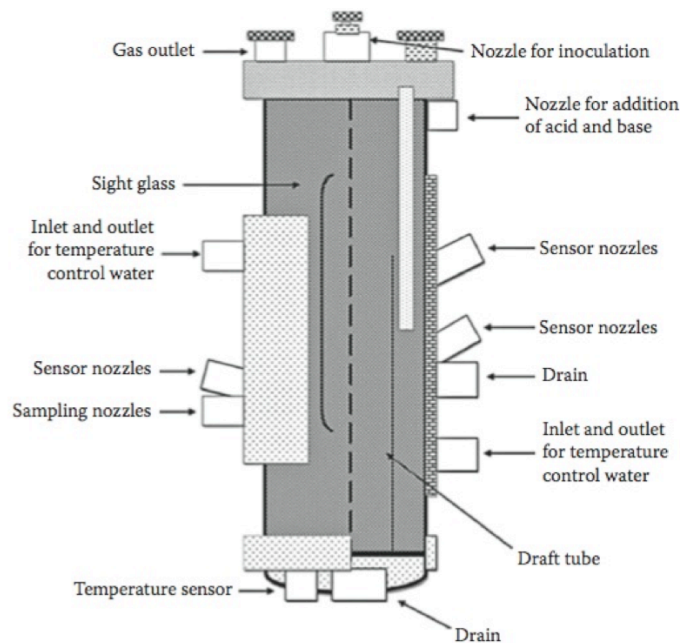


Figura 38: Reactor *airlift* con bucle interno (15)

En la Figura 38 se observa un reactor *airlift* vertical con todas sus entradas y salidas. En esta figura se tienen ocho entradas para el control y verificación de la fermentación, una entrada para el inóculo y medio de cultivo y finalmente, una salida para el drenaje y otra para la liberación de gases. Las entradas de control son unas boquillas para la revisión del pH, temperatura de fermentación, obtención de muestras, introducción de ácidos o bases, drenaje de emergencia, entre otros.

En investigaciones más recientes, Song et al. en 2009 utilizaron un reactor esférico modificado que era una mezcla entre un *airlift* y una columna de burbuja para convertir un cultivo agitado en una escala piloto para la producción de celulosa bacteriana. Para ello se construyó un reactor esférico con columna de burbuja de 50 L con una tensión de corte bajo y alta transferencia de oxígeno, éste se ilustra en la Figura 39. Se utilizó como medio de cultivo desperdicio de comida con alto grado de sacarosa debido a su bajo costo, así mismo se contrastó el uso del reactor de 50 litros con uno de capacidad de 10 litros. Se obtuvo un rendimiento de 5,6 g/L en tres días de cultivo (38). Un reactor *airlift* es una solución excelente para la fermentación de CB por su alto rendimiento en poco tiempo.

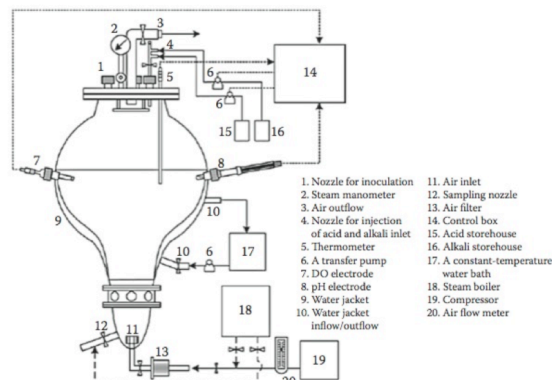


Figura 39: Reactor esférico airlift con columna de burbuja (15)

### Vía Estática

Desde los comienzos de las investigaciones hacia la producción de celulosa bacteriana, el cultivo estático ha sido considerado como el cultivo estándar. De acuerdo a algunos estudios, se obtiene una estructura supramolecular de CB más homogénea, resultando en un material muy estable. Como se ha mencionado anteriormente, al existir un cambio de condiciones de cultivo puede haber cambios drásticos y normalmente negativos en las propiedades de celulosa bacteriana. Por esta razón, investigadores han buscado las condiciones óptimas para un mejor rendimiento que incluyen temperatura, pH, concentración de oxígeno y medio de cultivo (15).

Un ejemplo de vía estática es la industria de la nata de coco, donde se utilizan recipientes de plástico que posterior a la inoculación se mantienen estáticos en un almacén entre 8 y 10 horas. Este proceso se ilustra en la Figura 40. Debido a que la celulosa se forma en la interface aire-líquido, cualquier producción comercial en recipientes requiere grandes proporciones de área. Así mismo, es mucho menos automatizado que un sistema agitado con un tanque por lo que requiere más trabajo manual y mayores costes de personal. Además, la producción de CB plana depende de los recipientes de reacción utilizados y por lo tanto, limitada en tamaño sin variación. En un proceso por lotes, la concentración de nutrientes varía durante el cultivo, limitando el tiempo máximo de cultivación y que requiere tiempos y costes de mantenimiento.



Figura 40: Recipientes de plástico para la producción de nata de coco (39)



También se han estudiado procesos de lotes alimentados donde se afirma que el tiempo de cultivo se puede alargar en condiciones estáticas si se alimenta con un nuevo medio de cultivo durante el bioproceso. Como se menciona anteriormente, en 1994 Toda et al. reportaron un incremento en el rendimiento de producción de CB utilizando un cultivo con un suministro continuo o periódico de fuentes de carbono por debajo de las películas de celulosa en su planta piloto HoLiR (15).

En 2007, Hornung et al. crearon un biorreactor de aerosol donde lograron resolver problemas tal como baja calidad de celulosa, secciones con diferentes resistencias mecánicas y crecimiento no deseado que se presentaban con un reactor de disco giratorio. En esta investigación, un spray con medio de cultivo se dispersaba para obtener una distribución homogénea y se utilizaba aire estéril para disminuir la contaminación. La recolección de los bloques de celulosa se realizaba manualmente desmontando el reactor para obtener porciones de 3 o 4 cm de grosor en lugar de un solo bloque (15).

#### Vía agitada y estática

En los últimos años se han desarrollado métodos de obtención de celulosa bacteriana que incluyen una combinación de los principios de cultivación estática y agitada, Saikiri et al. en 1998 desarrollaron un método para cultivo directo de filamentos de CB. Diseñaron un dispositivo que consiste en una bandeja de poca altura que conserva el cultivo en condiciones estáticas para una continua filamentación de gel de celulosa bacteriana. Un lado de la bandeja está curvada suavemente para permitir la recolección de la película de CB a través de una boca estrecha como se observa en la Figura 41. El filamento obtenido se enrolla lentamente en una cesta que está unida mientras que el gel de la CB se estira de un modo ligeramente torcido. Con esta tecnología patentada es posible sintetizar celulosa en la forma de cuerpos huecos de diferente longitud y espesor en el medio de cultivo. El tubo resultante, conocido también como BASYC®, es muy adecuado para aplicaciones microquirúrgicas debido a sus pequeñas dimensiones (15).

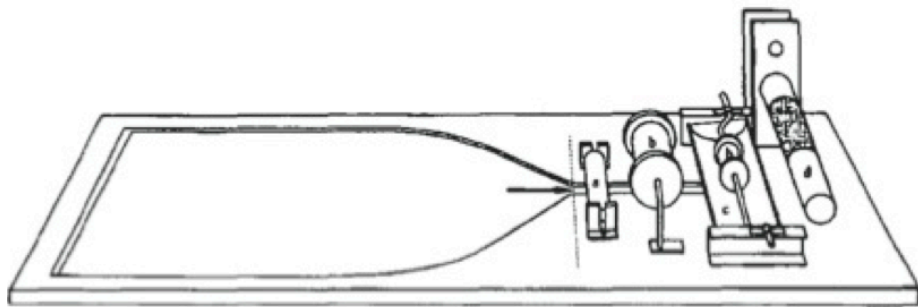


Figura 41: Esquema de la bandeja de cultivo para la filamentación directa de CB. (15)

#### Vía no-estática

Biorreactores de película no estáticos sin ser agitada por un agitador o removedor pero con el movimiento de discos, cintas transportadoras u otros métodos son utilizados en la producción de CB. Películas de celulosa nanobacteriana se obtuvieron por cultivo de organismos durante largos períodos de tiempo bajo condiciones no estáticas bajo la aplicación de transportadores lineales o discos en el modo de alimentación por lotes de rotación. Respecto al primero, un

transportador lineal pasa a través del cultivo contenido en recipientes recubiertos por una película de CB el cual se encuentra parcialmente deshidratado. En el reactor de discos se obtiene el mismo efecto y proporciona formas peliculares altamente hidratadas pero pueden dar lugar a un material no uniforme debido a la agrupación y agregación de capas delgadas o filamentos durante el cultivo (15). En la Figura 42 se observan los dos tipos de reactores antes mencionados.

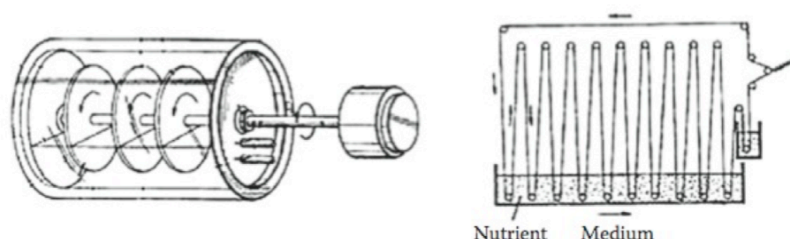


Figura 42: Biorreactores de disco (izquierda) y de transporte lineal (derecha) (15)

Como se afirmó anteriormente, se empezaron a utilizar discos o rodillos giratorios por Krystynowicz et al. en 2002. Una biopelícula específica se sumerge temporalmente en el medio líquido durante el cultivo. La CB se une y acumula en la superficie rugosa de los discos o rodillos los cuales rotan sobre el eje y se sumergen en el medio nutriente. En la Figura 43 (a) se observa el cultivo de CB en un reactor de disco mientras que en la Figura 43 (b) se observa celulosa unida a los discos después de 7 días de cultivo. Estos investigadores encontraron similitudes en el tiempo de cultivo de la síntesis de la celulosa bacteriana entre la fermentación por disco giratorio y por cultivo estático. Las diferencias encontradas se relacionaban con el grosor de la membrana el cual era mayor en el caso del disco giratorio. Por otra parte, hallaron que a una mayor velocidad de rotación, las membranas de celulosa acumuladas en los discos tenían mayor grosor a pesar del hecho que la masa total de celulosa era menor debido al mayor grado de hidratación de la celulosa (15).

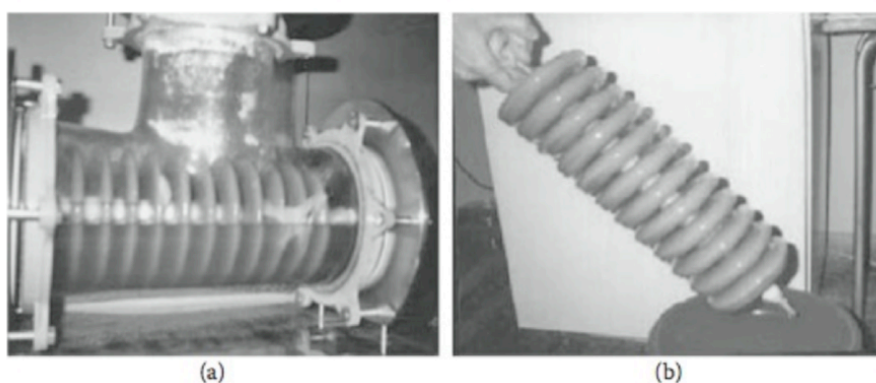


Figura 43: Biosíntesis de CB mediante un reactor RBC (15)

#### Vía semi-continua

Debido a la creciente demanda de una producción comercial de celulosa bacteriana plana para

material médico. Kralisch et al. en 2010 diseñaron un nuevo y eficiente proceso para la cultivación semi-continua de láminas de CB como se mencionó con anterioridad. Mediante el reactor llamado *horizontal-lift*, una cinta continua de celulosa con longitud seleccionable y espesor ajustable podía ser producida. El material plano de celulosa tiene la misma estructura de red 3D homogénea e imperturbable como cuando se utilizan condiciones estáticas (15).

Esta combinación de las ventajas del proceso continuo y los resultados del cultivo casi estático da lugar a una extracción suave de la CB. Una vez cultivada la celulosa, se levanta y se transporta fuera del aparato de cultivo mediante un dispositivo extractor en el lado opuesto del aparato, sin interrumpir la superficie del medio de cultivo y sin perturbar la lámina de CB. En el lado frontal del aparato nueva celulosa comienza a crecer en la parte libre de la interfaz entre el aire y el medio. Mediante este método se construyó la única planta piloto de CB vía semi-continua (15).

### 5.1.1. Efecto de la química

A grandes rasgos, dentro de todos los factores que influyen en la producción de CB, los principales factores que influyen en la producción de celulosa bacteriana son el pH, aditivos, medio de cultivo, condiciones ambientales, temperatura y presencia de subproductos (18). Muy recientemente también se ha desarrollado la modificación genética de la bacteria *G. xylinus* para un aumento de productividad (15).

El pH es un factor que debe de ser regulado y controlado durante todo el proceso de producción de celulosa bacteriana. El pH afecta a la estructura y permeabilidad de la membrana celular de la bacteria, lo cual afecta a la producción de CB. El pH decrece durante el proceso de fermentación debido a la acumulación de ácidos tal como glucónico, acético o láctico en el medio de cultivo. Además, es difícil de autorregular un pH óptimo utilizando un sensor ya que normalmente, el cultivo viscoso se engancha al sensor causando lecturas erróneas. Incluso en un reactor agitado una alta viscosidad en el cultivo causa una mezcla no-homogénea lo cual resulta en la adsorción de cultivo en el sensor (15) (18).

En la investigación hecha por Embuscado et al. en 1994 concluyeron que una fermentación debajo de un pH de 3,5 resulta en una no-producción de celulosa y la proliferación de la bacteria se afecta negativamente. Por otra parte, la bacteria demostró una recuperación de la exposición a bajo pH después de estar 8 días en condiciones óptimas de crecimiento. En el año 2000, Verschuren et al. demostraron que el pH óptimo para la producción de celulosa bacteriana se encuentra entre un pH 4 y 5, lo cual concuerda con los autores Noro et al., que realizaron su investigación en el año 2004 y describe que el pH óptimo es 4,5 (15). También intentaron buscar una manera de regular el pH durante la fermentación de celulosa y al utilizar la capacidad de tamponamiento del licor de maíz fermentado obtuvieron un pH constante dentro de lo óptimo y una producción alta de CB (18).

La producción de celulosa en un reactor es compleja principalmente porque el cultivo utilizado consiste en celulosa bacteriana sólida, células, medio líquido y gas del aire. La coagulación de CB forma un grumo en la superficie con células adheridas y un deterioro en la producción. Por tanto, una suspensión de celulosa bacteriana pequeña y homogénea es

necesaria para una agitación y transferencia de oxígeno adecuada. Para reducir considerablemente los grumos, se ha comprobado que la presencia de aditivos agua es efectiva y que por consecuencia se mejora la producción de celulosa bacteriana (18).

El agar y el alginato de sodio son dos polisacáridos aditivos que han demostrado que aumentan la producción de celulosa bacteriana en reactores (18). Bae et al. (30) estudiaron que el agregar agar entre 0 y 1% al reactor aumenta la productividad de CB de 8 a 12,8 g/L en la proporción óptima de 0,4% de agar agregado. El medio de cultivo con agar fue más viscoso y el número de células libres fue mayor que el cultivo sin aditivo, lo que sugiere que el agar puede impedir la coagulación de la celulosa en el medio. Por lo que se refiere al alginato de sodio, Zhou et al. (31) observaron que obstaculiza la formación de grandes grumos de celulosa y el rendimiento alcanzó los 6 g/L después de agregar 0,4% de alginato de sodio en comparación de una producción de 3,7 g/L en un medio sin aditivos (18).

El oxígeno en el medio de cultivo también juega un rol muy importante en el crecimiento de celulosa bacteriana. El oxígeno disuelto en la fermentación se puede variar con la velocidad de agitación. Tantratian et al. encontraron que un exceso de oxígeno disuelto en el medio aumenta el contenido de ácido glucónico por lo que reduce la producción de CB. Por otro lado, observaron que una baja concentración de oxígeno también reduce la producción de celulosa debido a que no proporciona suficiente oxígeno al cultivo en crecimiento. Finalmente, concluyeron que una concentración óptima de oxígeno disuelto para un sistema de lotes alimentados es del 10% (18).

Otros compuestos presentes pueden tener un efecto sobre las enzimas que estén implicadas en la vía donde se produce CB (15). Por lo que los cambios en los compuestos presentes afectan y tienen una influencia directa o indirecta en el crecimiento de celulosa (18). Buenos ejemplos de componentes esenciales que influyen al cultivo de CB presentes en el medio pueden ser el lactato, etanol, fuentes de carbono diversas, licor de maíz fermentado, entre otros (15).

En el caso del lactato, incrementa la producción de la bacteria *G. xylinus* ya que está ligado a la cadena respiratoria. El lactato genera energía y no actúa como sustrato adicional en la producción de celulosa. Esta fuente de energía adicional incrementa la concentración de bacteria en las primeras etapas de la fermentación, resultando una mayor producción de celulosa bacteriana. Agregar más lactato al medio de crecimiento resultará en un incremento en la producción de ATP (15).

La oxidación de etanol tiene el potencial de producir energía adicional para la bacteria de manera similar que el lactato. Sin embargo, el efecto de agregar etanol al medio de fermentación no es tan positivo como el adicionar lactato, lo cual depende en el hecho de que la oxidación del alcohol produce altos niveles de acetato. Una concentración elevada de acetato tiene un efecto negativo en el desarrollo de la bacteria por lo que es necesario que el etanol este completamente oxidado antes del comienzo de la oxidación del acetato ya que aumenta la biomasa. La conclusión a la que se llega es que el agregar etanol aumenta la

producción de celulosa bacteriana por la vía de incrementar la producción de energía pero no es tan eficiente como el agregar lactato (15).

La concentración de la fuente de carbono también se considera que afecta a la tasa de síntesis de celulosa bacteriana. Cuando se incrementa la concentración de sustrato, su utilización se disminuye, por lo que se necesita una concentración óptima para obtener una producción alta y consistente durante la fermentación. Independientemente de la fuente de carbono utilizada, existen dos fases de acuerdo a Kornmann et al. afirman que, durante la primera, se produce biomasa y ocurre la oxidación de acetato mientras que en la segunda etapa se oxida todo el acetato y solo se asimila la glucosa (15).

Uno de los componentes más utilizados recientemente es el licor de maíz fermentado ya que da excelentes resultados además de que se puede utilizar como medio de fermentación microbiano complejo. El LMF contiene aminoácidos donde la metionina es la esencial, ésta estimula el crecimiento de bacteria en las primeras etapas de fermentación y reduce el tiempo de retraso por lo que incrementa la producción de celulosa bacteriana. Así mismo, aminoácidos con amonio en LMF cuentan en un 95% de la concentración total de nitrógeno y se puede utilizar también como la fuente principal de nitrógeno en el medio de cultivo para los microorganismos (15). Otro hecho por el cual es utilizado frecuentemente es su propiedad de tamponamiento antes mencionada.

### 5.1.2. Pre-diseño del fermentador

El reactor elegido para esta planta piloto es un reactor *airlift* de bucle interno debido a los buenos resultados obtenidos en investigaciones previas. De acuerdo a los autores Al-Mashhadani et al. los biorreactores *airlift* proporcionan una alternativa atractiva a los tanques agitados debido a que la agitación no es mecánica sino por inyección de gas. También se menciona que, aparte de ser excelentes mezcladores, el *airlift* tiene largos tiempos de contacto gas-líquido, no causan daño a las células y se han visto buenos resultados en procesos biológicos tal como biomasa de levadura, vinagre, bacterias, entre otros (40).

El término de *airlift* cubre una amplia gama de dispositivos de contacto neumático gas-líquido-sólido que se caracterizan por la circulación de fluido definido por canales construidos específicamente para este fin. Los reactores *airlift* se sub-dividen en dos tipos que son los de bucle interno y externo, el primer tipo contiene unos deflectores colocados estratégicamente en un solo recipiente donde se crean los canales necesarios para la circulación gaseosa mientras que el segundo contiene conductos separados y distintos (41).

El análisis y la descripción del comportamiento hidrodinámico y transferencia de masa gas-líquido para el transporte aéreo los reactores *airlift* generalmente implican el uso de parámetros tal como velocidad de gas, acumulación de gas, velocidad superficial del líquido y la mezcla (42). La estimación de los parámetros esenciales de diseño del reactor *airlift*, tal como los mencionados anteriormente y la magnitud de la velocidad de circulación del líquido están limitadas a la geometría del reactor. Una de las características principales de los reactores *airlift* es la circulación del líquido inducida y que se alcanzan unas velocidades

lineales de líquidos elevadas las cuales conducen a una mejor turbulencia, mezcla y transferencia de calor y masa. (43)

Todo reactor *airlift* está compuesto por cuatro secciones distintas con diferentes características de flujo, las cuales se ilustran en la Figura 44 y se denominan: Tubo de salida, Tubo de descenso, Base y Separador de gas. Así mismo en la Figura 45 se observa un modelo sencillo de éstas. En la primera sección el gas se inyecta en la parte inferior y el flujo de gas y líquido es predominante hacia arriba. La segunda sección es paralela a la columna ascendente y se conecta al tubo de salida en la parte inferior y superior, y el flujo de gas y líquido es predominante hacia abajo. La fuerza motriz para la recirculación es la diferencia de densidad media entre el tubo descendente y ascendente; esta diferencia genera el gradiente de presión necesaria para la recirculación del fluido. Se cree que la sección llamada base no afecta significativamente el comportamiento global del reactor pero el diseño de esta sección puede influir en la acumulación de gas, la velocidad del líquido y el flujo de fase sólida. Finalmente, la sección de separador de gas conecta el tubo de salida con el de descenso, facilitando líquido de recirculación y el gas de liberación. Los diseños que permiten un tiempo de residencia del gas en el separador mucho mayor del necesario para desprender las burbujas, minimizará la fracción de gas recirculando a través del tubo de descenso (41).

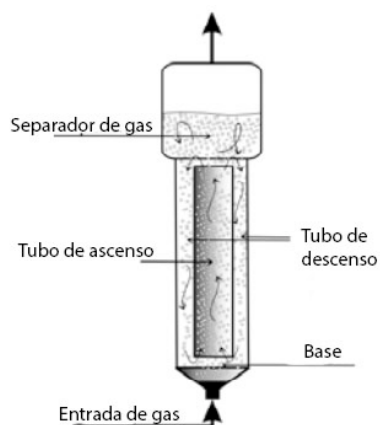


Figura 44: Diagrama esquemático de tanque airlift

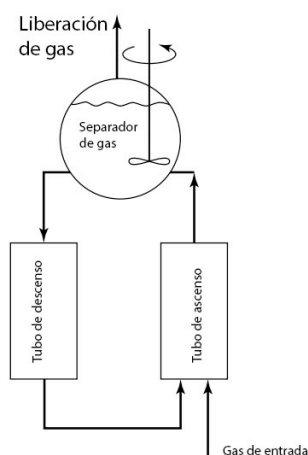


Figura 45: Modelo sencillo de las secciones principales de un airlift (46)

En primer lugar, para poder definir el dimensionamiento del reactor se tiene que definir la producción anual que se tendrá. Por ser una planta piloto, la producción anual será de 1.350 kg/año y también se precisa que la planta trabajará 50 semanas al año, teniendo en cuenta 2 semanas de periodo vacacional. Mediante estas suposiciones se puede calcular la producción semanal como se muestra en la Ecuación (1).

$$P_{semanal} = 1350 \frac{\text{kg}}{\text{año}} \cdot \frac{1}{50 \text{ semanas}} = 27 \frac{\text{kg Celulosa Bacteriana}}{\text{semana}}$$

Ecuación (1)



Debido a que se ha demostrado ser más efectivo un sistema de lotes en estudios comentados anteriormente, el diseño de la planta piloto será mediante este método. También, se tomará de referencia el rendimiento de la publicación de Laboreur (44), el medio de cultivo investigado por Zahan et al. (35) y el aditivo óptimo declarado por Zhou et al. (31).

Laboreur obtuvo un rendimiento de  $10 \frac{g}{l \cdot d}$  con un tiempo de fermentación de 45h. Consideraremos que cada lote tendrá una duración de 48h y se realizarán tres lotes por semana. Dado a esto, se obtiene el cálculo expresado en la Ecuación (2) de donde podemos obtener el volumen del reactor. En este caso el volumen que se obtiene es de 450 litros. Pero también se tiene que considerar que el volumen útil es un 75% del volumen real. Para realizar el cálculo del volumen final del reactor como lo muestra la Ecuación (3) y queda un volumen real de 600 litros. Como se ha mencionado en estudios anteriores, el tener un reactor muy grande reduce la eficiencia por lo tanto, se instalarán tres reactores con un volumen de 200 litros y 150 litros de volumen de trabajo.

$$27 \frac{kg}{semana} = V_R \cdot 10 \frac{g}{L \cdot d} \cdot \frac{2 \text{ dias}}{\text{lote}} \cdot \frac{3 \text{ lotes}}{\text{semana}} \cdot \frac{1 kg}{1000 g}$$

Ecuación (2)

$$V_R = 75\% V_F$$

Ecuación (3)

Al tener el volumen objetivo de trabajo de cada biorreactor, sus dimensiones se obtendrán de una relación con la Tabla 16 proporcionada por el fabricante BioReactor Sciences® la cual contiene cinco dimensionados de reactores conforme a la necesidad del volumen y en la Figura 46 se observa la nomenclatura de las cotas (45).

Volumen	A	B	C
30 L	168 mm	1360 mm	252 mm
50 L	200 mm	1600 mm	300 mm
100 L	255 mm	2150 mm	383 mm
300 L	365 mm	2960 mm	548 mm
500 L	450 mm	3200 mm	675 mm
Volumen	D	E	F
30 L	101 mm	1234 mm	302 mm
50 L	120 mm	1450 mm	360 mm
100 L	153 mm	1959 mm	459 mm
300 L	219 mm	2686 mm	657 mm
500 L	270 mm	2863 mm	810 mm

Tabla 16: Dimensiones reactores Airlift de fabricante en diferentes volúmenes (45)

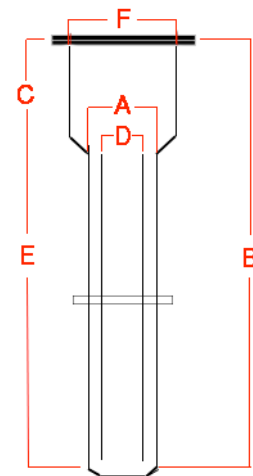


Figura 46: Diagrama de reactor Airlift con loop interno para dimensionado (49)



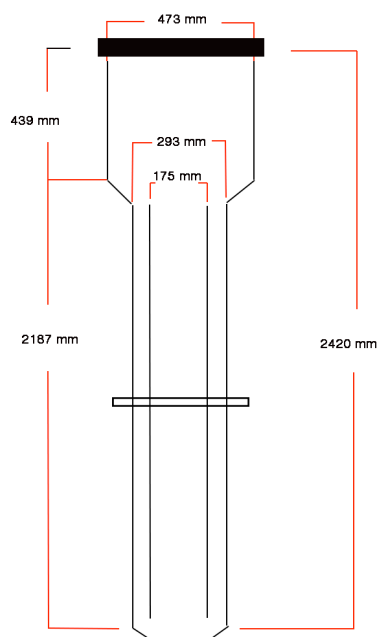


Figura 47: Pre-diseño fermentador airlift

Característica	Valor
Temperatura	30°C
pH	4,5
Volumen	200 L
Volumen de trabajo	150 L
Entradas	1: Inóculo 2: Entrada de gas 3: Ajuste pH
Salidas	1: Desagüe 2: Salida de gases 3: Toma de muestras
Sensores	1: Temperatura 2: pH
Velocidad de aireación	0,6 vvm

Tabla 17: Características esenciales del reactor

Respecto a los datos anteriores se realiza una regresión para obtener las dimensiones del reactor de 150 litros que se utilizará. En la Tabla 18 se observa la dimensión obtenida para cada cota, el coeficiente de determinación y el tipo de regresión utilizado. En la Figura 47 se ilustra el fermentador *airlift* con sus respectivas dimensiones.

	Dimensión (mm)	R <sup>2</sup>	Regresión
A	293 mm	0,9871	Exponencial
B	2420 mm	0,9735	Logarítmica
C	439 mm	0,9767	Potencial
D	175 mm	0,9763	Potencial
E	2187 mm	0,9714	Logarítmica
F	473 mm	0,9763	Potencial

Tabla 18: Dimensiones de airlift de 150 L

El fermentador constará de las características que se observan en la Tabla 17. Tendrá una temperatura de trabajo de 30°C que se controlara a través el sensor 1 de temperatura, un pH controlado de 4,5 que se controlará a través del sensor 2 de pH pero si es necesario se agregará NaOH o HSO<sub>4</sub> a través de la entrada 3. Adicional a esta entrada, tendrá entrada para el inóculo y medio de cultivo, el cual estará en la parte superior con una válvula y, la entrada de gas que será aire enriquecido con oxígeno. De salidas contará con tres, una para la toma de muestras, otra para la salida y evacuación de gases y finalmente, la de desagüe la cual contará con una válvula colador simplex para la recolección y filtro del producto terminado.

### 5.1.3. Selección de condiciones óptimas

Dentro de la selección de condiciones óptimas se analizará primeramente por cada etapa y consistirá en dimensionamiento, temperatura, aditivos, concentraciones y pH. Como se menciona anteriormente, se tendrá una producción de 1.350 kilogramos anualmente, un rendimiento de 10 g/L·d, el medio de cultivo de Zahan et al. (35) y el aditivo óptimo declarado por Zaou et al. (31).

Respecto al medio de cultivo, Zahan et al. propusieron uno con buenos resultados que se basaba en desperdicios de piña. Además de reducir los costes de materia prima, los desperdicios de piña tienen una gran variedad de azúcares por lo tanto, se utilizará en esta planta este medio de cultivo que en la Tabla 19 se observa su composición (35). Esta materia prima consiste principalmente de la pulpa, corteza, tallo y hojas de piña y se obtiene de la cosecha y procesamiento de esta fruta, donde se produce una gran cantidad de residuos. De hecho, un manejo descuidado de las frutas y la exposición a condiciones ambientales adversas durante el transporte y almacenamiento puede causar hasta un 55% de residuos del producto. Además, el secado, almacenamiento y transporte de dichos residuos es rentable y por tanto, eficiente, barato y respetuoso con el medio ambiente (46).

Composición	Desperdicio líquido	
	Antes de esterilizar	Después de esterilizar
<b>Demanda química de oxígeno (DQO) (g/L)</b>	100,8	103,7
<b>Azúcar reductor (g/L)</b>	39,20	41,20
<b>Azúcar total (g/L)</b>	100,0	100,9
<b>Dextrano (g/L)</b>	1,5	1,5
<b>Rafinosa (g/L)</b>	2,6	1,5
<b>Sacarosa (g/L)</b>	40,1	40,1
<b>Glucosa (g/L)</b>	23,6	23,6
<b>Galactosa (g/L)</b>	1,7	2,10
<b>Fructosa (g/L)</b>	14	15,6
<b>pH</b>	4,0	4,0

Tabla 19: Composición de desperdicios de piña analizados por Zahan (35)

El aditivo mencionado por Zhou et al. (31) es el alginato de sodio el cual demostró ser un potenciador de la productividad de *G. xylinus*. Este aditivo es muy utilizado en la industria alimentaria y está reconocido por la FDA (Food Drug Administration) de los Estados Unidos como inocuos y seguros. La aplicación del alginato de sodio se basa en su habilidad de espesante al ser disuelto en agua, generando un aumento en la viscosidad de la solución (47). Los autores encontraron diferencias significativas entre cultivos con el aditivo con los que no lo tenían, donde la más importante fue un aumento de la producción de CB. Es por esto que se ha decidido utilizar este aditivo en el caso de estudio con una concentración de 0,04%.

Una vez definidos los parámetros básicos de diseño, se definirán las condiciones óptimas de cada etapa de la planta. Durante la *fase I: Inóculo*, que se ilustra en la Figura 48, en el mezclador se realizará la mezcla de medio de cultivo con desperdicios de piña, el cual debe de estar colado y filtrado previamente, extracto de levadura (6 g/L), bactopecton (1,49 g/L), fosfato de monopotasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (1,08 g/L) y sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) (0,06 g/L) a una temperatura ambiente. En cada lote se mezclará un 10% del volumen total que, como se ha mencionado anteriormente, corresponde a 150 litros por lo que la mezcla será de 15 litros. Una vez acabada la mezcla, se esterilizará en una autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos con hidróxido de sodio [2M]. Posteriormente, la mezcla necesita enfriarse hasta los  $28^\circ\text{C}$  por lo que se introduce en un enfriador industrial hasta que llegue a la temperatura necesaria. Finalmente, se introduce nuevamente en el mezclador para agregar la bacteria *G. xylinus*. El pH de toda la etapa se mantendrá constante gracias al medio de cultivo de desperdicios de piña a 4,5.

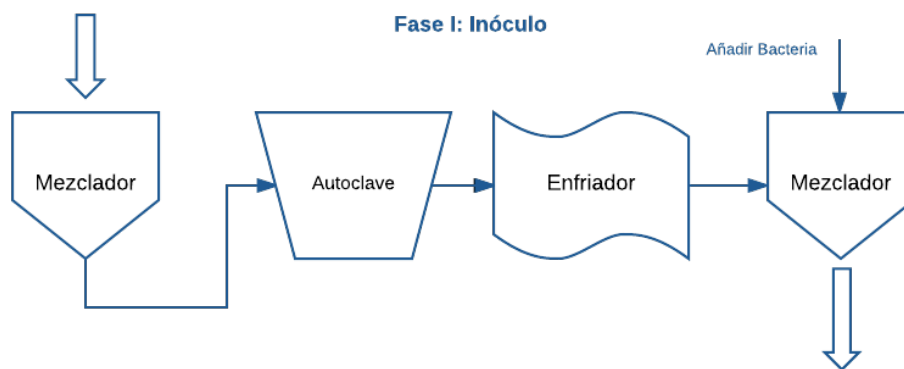


Figura 48: Diagrama de fase I: Inóculo

En el caso de la fase II: medio de cultivo observado en la Figura 49, se realiza la misma mezcla que en el inóculo pero con el 90% del volumen del reactor y sin presencia de la bacteria, además se le agregará el aditivo Alginato de sodio al 0,04% mencionado anteriormente. Así mismo, en el mezclador se tendrá una temperatura ambiente y un pH de 4,5 controlado por los desperdicios de piña. De la misma manera que en la fase anterior, en la autoclave se realizará una esterilización a  $121^\circ\text{C}$  con hidróxido de sodio [2M] y en el enfriador industrial se llegará a una temperatura de  $30^\circ\text{C}$ .

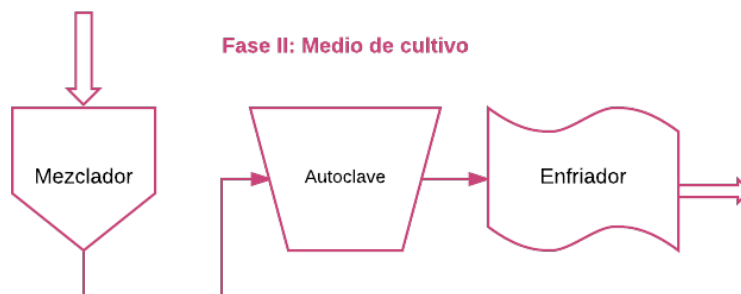


Figura 49: Diagrama de fase II: Medio de cultivo

En la fase III se introducen ambas mezclas realizadas en la fase I y II al reactor que en este caso será Batch y su duración será de 48h. El reactor será un *airlift* de 200 litros con una

temperatura constante de 30°C y un pH controlado en 4,5 con la adición de NaOH [4M]. A este reactor como se observa en la Figura 50, se le agregará el inóculo de 15 litros de inóculo preparado en la fase I y 135 litros de medio de cultivo obtenido en la fase II para obtener los 150 litros dichos. De acuerdo a la Ecuación (4), se tendrá una producción de 3 kilogramos de celulosa bacteriana en cada lote por reactor con un rendimiento de 10 g/L·d.

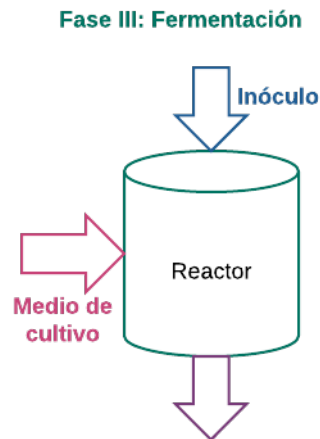


Figura 50: Diagrama Fase III: Fermentación

$$\text{Gramos de CB por lote por reactor} = 10 \frac{g}{L \cdot d} \cdot 150 \frac{L}{Rector} \cdot 2 \frac{días}{lote} = 3000 \frac{g}{Rector \cdot lote}$$

Ecuación (4)

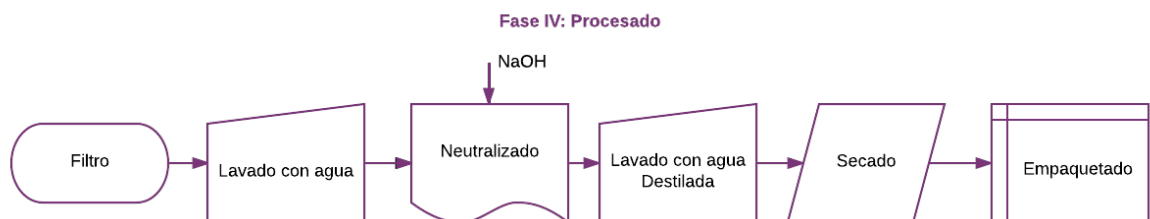


Figura 51: Diagrama de la fase IV: Procesado

Finalmente, se procesa el producto como se observa en Figura 51, donde en primer lugar se filtra para recuperar la celulosa obtenida. En este proceso se utiliza un colador o un filtro donde se separa el producto con el medio líquido. Posteriormente, se realiza un lavado con agua destilada a temperatura ambiente y como paso siguiente una neutralización con NaOH [1M] a 30°C para eliminar cualquier residuo de célula de *G. xylinus*. Al finalizar este paso, se tendrá que hacer un tratamiento de residuos con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para poder procesarlos correctamente. Por consiguiente, se realiza un nuevo lavado con agua destilada y un secado a 80°C por 8 horas a través de un secador industrial. Por último el producto se empaqueta

para su posterior distribución. El residuo obtenido del reactor se puede reutilizar para crear inóculo del siguiente lote.

## 5.2. Plan general de la planta

### 5.2.1. Condiciones esenciales de operación

Para que la planta piloto funcione correctamente se necesitan ciertas condiciones esenciales de operación para que funcione con seguridad y economía. Éstas serán descritas a continuación divididas por cada una de las etapas antes mencionadas.

En la fase I, se realizará la trituración de los desperdicios de piña, el filtrado posterior, el mezclado con el resto de los ingredientes, la esterilización y enfriado. Para la trituración de desperdicios se tendrá una velocidad de 160 kilogramos de desperdicio por hora; la esterilización se realizará a la temperatura óptima antes mencionada ya que al ser baja no se tiene ningún peligro ni gasto energético excedente. El enfriado será de 121°C a 30°C utilizando un equipo de capacidad pequeña (200 litros) para poder realizar el intercambio de calor eficiente. La fase II tiene el mismo procedimiento descrito.

La fase III de fermentación, se utilizará el reactor *airlift* mencionado el cual óptimamente trabaja a 30°C y un pH de 4,5. Al ser una temperatura baja y un pH poco ácido estas serán las condiciones seleccionadas por representar un peligro menor. Finalmente, en la última fase de procesado de la CB, se tendrán que hacer dos lavados con agua destilada y uno con hidróxido de sodio. En investigaciones se menciona que el lavado óptimo con NaOH se tendría que hacer durante 8 horas con el hidróxido hirviendo con la finalidad de eliminar cualquier residuo de célula pero al ser un reactivo corrosivo e irritante se decide realizar el lavado en bandejas estáticas a 30°C durante 15 minutos. Como último paso, el producto una vez purificado y neutralizado, se introduce en un horno a una temperatura óptima de 80°C durante 8 horas, en este caso se podría reducir la temperatura de secado a 70°C ya que se aprovechará las horas nocturnas para realizar el secado por lo que estará en el horno por 10 horas y se reducirá el consumo energético.

Respecto al reactor seleccionado, es una versión cara de los biorreactores disponibles ya que se podría utilizar un cultivo estático que no tenga consumo de oxígeno ni de energía. Como se ha mencionado anteriormente, un cultivo estático tiene rendimientos bajos ya que evita que la bacteria tenga contacto con la atmósfera y se inhibe, por este motivo se descarta.

### 5.2.2. Materiales

Las materias primas que se recibirán en la planta piloto se especifican en la Tabla 20, añadiremos el costo para posteriormente obtener el coste de producción anual.

<b>Materia prima</b>	<b>Composición</b>	<b>Unidad</b>	<b>Costo</b>
<b>Desperdicios de piña</b>	Sólido	Saco 25 kg	-
<b>Extracto de levadura</b>	Sólido	Bote 2,5 kg	312€
<b>Bactopepton</b>	Sólido	Bote 500 g	85€
<b>Fosfato de monopotasio</b>	Sólido	Saco 25 kg	80 €
<b>Sulfato de magnesio</b>	Sólido	Saco 1 kg	27€
<b>Hidróxido de sodio</b>	Sólido	Saco 25 kg	32€
<b>Ácido sulfúrico</b>	Líquido	Bote 18 L	95€
<b>Agua destilada</b>	Líquido	Bote 20 L	28€
<b>Bacteria <i>G.xylinus</i></b>	Sólido	Donación	-

Tabla 20: Materias primas utilizadas en la planta piloto

Para la selección adecuada de los materiales utilizados para la tubería se ha de tener en cuenta el producto a transportar, sus características químicas, la temperatura, la abrasión y la corrosión que pueden provocar en los tubos. En la Tabla 21 se observa los materiales seleccionados para la tubería que está en contacto con el producto de acuerdo al manual de estándares de ingeniería ASME B31.3 (48)

<b>Material de tubería</b>	<b>Uso</b>	<b>Código ASME B31.3</b>	<b>Material</b>
<b>PVC</b>	Tubería de agua	PS-500	ASTM D1784
<b>Acero inoxidable</b>	Tubería de vapor	PS-214B	ASTM A312
<b>PVC</b>	Utilizado para transportar mezclas a temperatura ambiente.	PS-500	ASTM D1784
<b>Acero inoxidable</b>	Transporte sustancias con hidróxido de sodio	PS-209	ASTM A312

Tabla 21: Lista de materiales utilizados en la instalación de tuberías

Para el transporte del medio de cultivo e inóculo se utilizarán barriles de 55 galones (208 litros) de lámina de acero al carbón rolada en frío con tapa desmontable. Sus dimensiones son 572 mm de diámetro y 851 mm de alto, se puede observar el modelo en la Figura 53. Así mismo el transporte de barriles se realizará con un transportín adecuado para barriles como se observa en la Figura 53 debido a que el peso del barril una vez lleno será demasiado para un transporte manual adecuado y eficiente. Este modelo (DT250) tiene la opción de elevar el barril con una polea hidráulica la cual soporta 250 kilos y lo puede elevar hasta 345mm. Esta elevación será útil para el vaciado del producto en maquinaria.



Figura 53: Barril de 55 galones de acero



Figura 53: Transportín de barriles

Respecto a las válvulas a utilizar serán de compuerta las cuales se instalarán en las tuberías conectadas a las entradas y salidas de los reactores. Estas válvulas tienen una baja caída de presión, cierre hermético, bajo costo y su funcionamiento es sencillo. Se instalarán nueve válvulas de este tipo la cual se ilustra en la Figura 54 (49).



Figura 54: Válvula de compuerta

Para tener un control de la temperatura se utilizarán termómetros digitales con una sonda larga desmontable para poder hacer lecturas de barriles de 200 litros. El rango de medida va de  $-50+200^{\circ}\text{C}$  lo cual es suficiente. Éste se ilustra en la Figura 56 y es fabricado por Alla France. Así mismo, la medición y control del pH en todo momento es crítico para una buena producción de celulosa bacteriana. Por este motivo se utilizará un medidor de pH digital de lectura rápida de la marca Fisher Scientific ilustrado en la Figura 56.



Figura 56: Termómetro digital con sonda larga



Figura 56: Medidor de pH Oakton® a prueba de agua



### 5.2.3. Dibujo de la planta

Para disminuir el costo de instalación de bombas o maquinaria para el llenado del reactor se ha decidido hacer un diseño de dos plantas para aprovechar la fuerza de la gravedad para el movimiento de fluidos. En la segunda planta se hará todo el proceso de preparación previo al llenado del reactor y en la primera planta se tendrá los reactores y todo el proceso posterior a la obtención de celulosa bacteriana.

Como se observa en la Figura 57, la planta baja consta de una sala de control, un pequeño almacén de producto terminado, una recepción de trabajadores y una general, un área de recepción de materia con ascensor y el área de producción. En ésta última estarán tres reactores *airlift*, el horno de secado, mesas de trabajo para el tratamiento posterior de baño de agua destilada, neutralización y empaque. La altura que debe de tener la nave en la planta baja debe de ser de 3 metros para que no se tenga problemas con la altura de los reactores.



Figura 57: Plano de planta 0 de la planta piloto

Por otro lado, en la segunda planta tal como se ilustra en la Figura 58 consta de cinco áreas principales: área de descanso, área de producción, área de descarga, almacén de materia prima, laboratorio de control y oficinas. La primera consta de lavabos, taquillas y un comedor; el área de descarga tiene acceso al ascensor y al almacén de materia prima. Respecto al laboratorio de control y las oficinas tienen un acceso independiente al área de producción por motivos de seguridad e higiene. Sin embargo, el laboratorio tiene una puerta de acceso al área de producción para el estudio de muestras y salida de emergencia.



Planta 1

Figura 58: Plano de planta 1 de la planta piloto

El área de producción contiene los elementos necesarios para el preparado de inóculo y medio de cultivo. Estos elementos son el procesador de desperdicios de piña, el área de mezclado donde se mezclan todos los componentes de las mezclas, el autoclave para la desinfección, el enfriador industrial de las mezclas y finalmente un vertedero el cual está conectado a los tres reactores con respectivas válvulas para el correcto llenado de cada reactor.

Respecto al vertedero, en la Figura 59 se observa la manera en que se conectará desde la segunda planta con los tres reactores. Se debe de instalar una válvula a la salida del vertedero y a la entrada y salida de cada reactor para el control de los flujos. La tubería en horizontal no deberá de ser más grande que 5 metros y la vertical no mayor a 3 metros. Respecto al vertedero, tendrá una capacidad máxima de 300 litros por lo que sus dimensiones serán de 600 mm de diámetro y altura de 1050 mm.

#### 5.2.4. Flujos

Al ser una planta piloto Batch, solo se encontrará un flujo a la entrada de los reactores, a su salida y en la salida del vertedero. Así mismo, como se introducirá las mezclas independientemente a cada reactor, el máximo volumen que circulará por las tuberías será de 150 litros. Deseamos que el reactor se llene en 30 segundos por lo que se tendrá un flujo de 300 litros/minuto o  $1,67 \times 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$ . Para determinar el grosor de la tubería que se ha de instalar, se determina que la velocidad del flujo no debe de superar 1 m/s. Sabiendo esta información se utiliza la Ecuación (5) para determinar el diámetro de la tubería.

$$d = \sqrt{\frac{Q_w}{3600 \cdot v} \cdot \frac{4}{\pi}}$$

Ecuación (5)

Siendo:

l: longitud de tubería (m)

$Q_w$ : Flujo del líquido ( $\text{m}^3/\text{s}$ )

d: Diámetro de tubería (m)

v: Velocidad fluido ( $\text{m}/\text{s}$ )

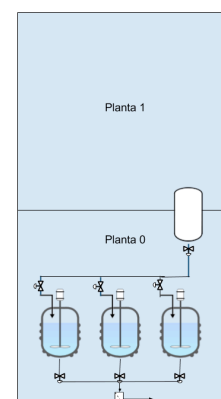


Figura 59: Diagrama de conexión entre vertedero y reactores

Al realizar estos cálculos se obtiene un diámetro de 8 cm, es decir 3,14 pulgadas por lo que nos referiremos a una tubería de 3 pulgadas de diámetro.

### 5.2.5. Operaciones básicas

De las operaciones básicas que conforman el sistema se explicará una a una, su funcionamiento y características básicas.

**Licuada/Procesador** – Esta operación consistirá en licuar los desperdicios de piña que se encuentran en estado sólido para convertirlos en estado líquido. En este caso, se utilizará el modelo IMC526 el cual se ilustra en la Figura 60 con una capacidad de 200 kilogramos por hora, un motor de 0,55 kW y 0,75 HP. Tiene unas dimensiones de 865mm x 400mm x 600mm y requiere de una conexión de agua de 15 mm con una presión mínima de 0,4 bar y tendrá un consumo de agua entre 11 y 14 litros por minuto.



Figura 60: Procesador de desperdicios de piña



Figura 61: Mezclador de barriles

**Mezclador**- Se utilizará un mezclador de barril fabricado por Mixer-Direct ilustrado en la Figura 61. El modelo de 1 HP de potencia tiene tres impulsores de acero inoxidable para mejorar la mezcla y está hecho con el objetivo de mezclar barriles de 200 litros a una velocidad de 1750 rpm. Sus especificaciones se muestran en el Anexo A.

**Autoclave**- El autoclave será vertical con vapor a alta presión. El modelo seleccionado es el VA-FJ150 fabricado por Bluestone de capacidad de 150 litros con estructura de acero inoxidable y con protección de temperatura y presión. Algunas de sus características se observan en la Tabla 22 y el resto de ellas se encuentra en el Anexo A.


<b>Volumen de esterilización</b>	Ø 510 x 740mm	
<b>Presión de trabajo</b>	0,22 MPa	
<b>Potencia</b>	6 kW	
<b>Dimensiones</b>	670mm x 690mm x 1130mm	
<b>Peso</b>	110 kg	

Tabla 22: Características técnicas del autoclave VA-FJ150 de Bluestone (50)

**Enfriador** – En este caso se utilizará un tanque para almacenar y enfriar el medio de cultivo posterior al esterilizado. Tendrá la tarea de reducir la temperatura del medio de 121°C a 30°C para agregar la bacteria posteriormente. Se utilizará un enfriador de acero inoxidable AISI 304 fabricado por FIC de una capacidad de 300 litros el cual es eléctrico, se encuentra ilustrado en la Figura 62 y sus especificaciones se muestran en el Anexo A. Utiliza un refrigerante R404A, un voltaje de 230V y 50 HZ y una sola fase. Tiene un control digital de la temperatura, un mezclador para agilizar el cambio de temperatura y un compresor de 31 HP que se encuentra en la parte inferior de la estructura.



Figura 62: Enfriador del medio de cultivo

**Filtro/Colador** Para acelerar el mecanismo de separación de la celulosa bacteriana y el medio de fermentación se instalará una colador simplex a la salida del reactor. Su funcionamiento se basa en una vez vaciado el reactor, se recolectará el producto a través de la cesta que tiene en el interior como se muestra en la Figura 63. El fabricante es Hayward y está hecho de PVC con juntas de FPM (Fluoroelastómero polímero). Las características técnicas se encuentran en el Anexo A.

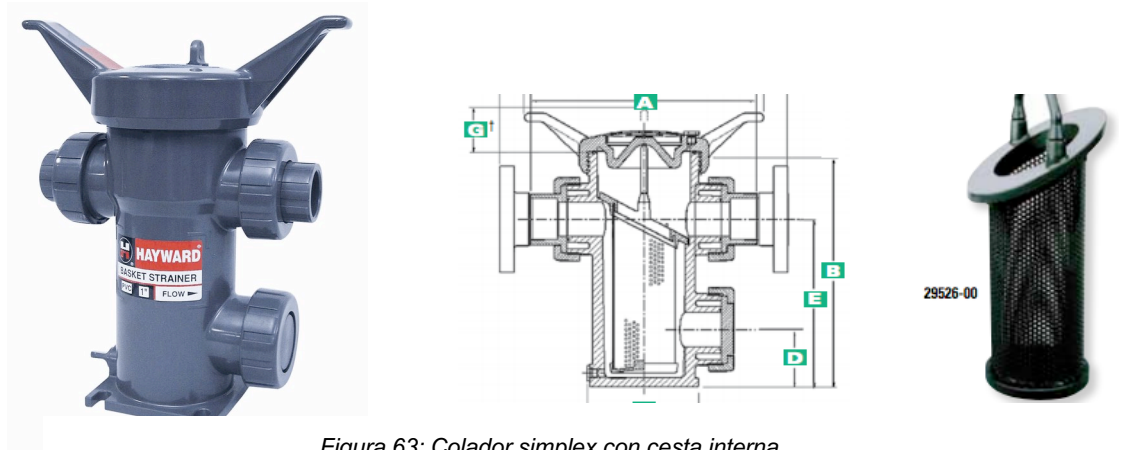


Figura 63: Colador simplex con cesta interna

**Válvula de bola** – De acuerdo al fabricante del colador simplex, se recomienda instalar una válvula de bola inmediatamente antes de éste para poder extraer la cesta. Por esta razón se instalará una válvula esfera Georg Fischer de PVC-U, de juntas de FPM y sello esférico de teflón ilustrada en la Figura 65.



Figura 65: Válvula de bola

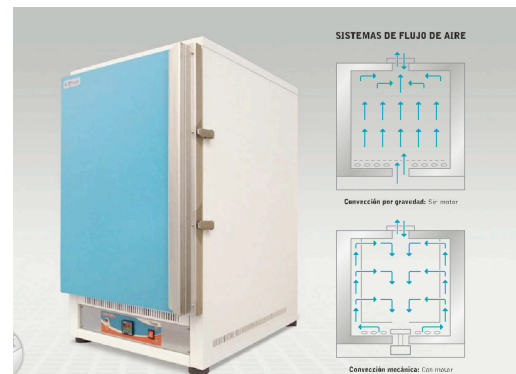


Figura 64: Horno de secado Terlab con sistema de flujo de aire horizontal

**Horno de secado** – El tratamiento de la celulosa bacteriana incluye secarla por lo que se instalará un horno de secado de flujo horizontal por convección mecánica. El horno seleccionado es fabricado por Terlab y tiene una cámara interior de acero inoxidable con doble charola. También tiene un rango de temperatura de +5°C a 250°C con un sensor de platino, una capacidad de 91 litros, un amperaje de 12,5 A y una potencia de 1.500 Watts. Sus medidas exteriores son de 62x64x82 centímetros y de la cámara son de 45x45x45 centímetros. Se ilustra en la Figura 64 y sus especificaciones se encuentran en el anexo A.

### 5.2.6. Rendimientos

El rendimiento de cualquier diseño ingenieril es importante para poder buscar una mejora y tener una referencia para detectar problemas de baja eficiencia. En este caso en particular, al ser un proceso biológico se realizará una comparación de la cantidad de polisacáridos presentes en el medio de cultivo ya que son los componentes asimilados por *G. xylinum* para la producción de celulosa bacteriana. Para realizar este contraste, se analiza los componentes

polisacáridos presentes en los desperdicios de piña y posteriormente, se compara con la producción obtenida de celulosa bacteriana para de esta manera obtener un rendimiento.

En la Tabla 19 se observa la composición los desperdicios de piña en donde los polisacáridos mencionados son asimilados por las bacterias presentes en el medio para producir CB. Por fines prácticos, se realizará la comparación con un lote del reactor, por lo que se tiene un volumen total de 150 litros de desperdicios de piña como sustrato y se obtiene 3000 gramos de celulosa bacteriana. Dentro de los componentes polisacáridos del sustrato, únicamente se excluirá para el cálculo la rafinosa ya que es el único que es un hidrato de carbono y no es fácilmente digerido por la bacteria debido a que es una molécula compleja (51). El peso de cada polisacárido en 150 litros de desperdicio se observa en la Tabla 23 obteniendo una sumatoria de 12.435 gramos realizando la exclusión mencionada.

Componente	Peso en 150 litros de desperdicio (g)
<b>Dextrano</b>	225
<b>Rafinosa</b>	225
<b>Sacarosa</b>	6.015
<b>Glucosa</b>	3.540
<b>Galactosa</b>	315
<b>Fructosa</b>	2.340
<b>TOTAL</b>	12.435 gramos

Tabla 23: Composición componentes polisacáridos de desperdicios de piña

Una vez realizado este cálculo, se procede a calcular el rendimiento de cada fermentación con la cantidad de CB producida. Al obtenerse 3.000 gramos de producto por cada 12.435 gramos de sustrato, se obtiene un rendimiento del 24,12% con la Ecuación (6).

$$\text{Rendimiento} = \frac{3.000 \text{ gramos CB}}{12.435 \text{ gramos Sustrato}} \cdot 100 = 24,12\%$$

*Ecuación (6)*

Con el resultado de la Ecuación (6) se puede comparar con el rendimiento obtenido del estudio realizado por Zhou et al. (31) que utiliza alginato de sodio para incrementar la producción de CB. Estos autores consiguieron un rendimiento del 27% para la muestra con el aditivo mientras que para la muestra de control únicamente un 24%. Es decir, el rendimiento alcanzado en el caso de estudio es muy semejante al obtenido en el estudio mencionado por esta razón se acepta.

Así mismo, se puede comparar la tasa de producción por hora de la planta piloto en cuestión con otros estudios en diferentes condiciones de cultivo. En la Tabla 24, se observan diferentes resultados donde se identifica el aparato utilizado, el método de cultivo, la fuente de carbono y la tasa de producción.

Fermentador	Método de cultivo	Fuente de carbono	Tasa de producción
<b>Frasco Agitado</b>	Batch	Glucosa	0,08 g/L·h
<b>Tanque agitado</b>	Continuo	Fructosa	0,95 g/L·h
<b>Reactor</b>	Fed-Batch	Glucosa	0,31 g/L·h
<b>Reactor</b>	Fed-Batch	Molasa	0,11 g/L·h
<b>Reactor</b>	Batch	Fructosa	0,074 g/L·h
<b>Reactor</b>	Batch	Fructosa	0,20 g/L·h
<b>Reactor <i>Airlift</i></b>	Batch	Fructosa	0,20 g/L·h
<b>Reactor <i>Airlift</i></b>	Batch	Fructosa con agar	0,20 g/L·h
<b>Disco rotatorio</b>	Batch	Glucosa	0,02 g/L·h

Tabla 24: Comparativo de producción de CB bajo diferentes condiciones de cultivo (30)

La tasa de producción que se obtiene de la planta piloto en cuestión con reactor *airlift* es de 0,42 g/L·h por lo que representa que es el doble que utilizando el mismo aparato pero con fuente de carbono de fructosa. Esto es debido a que los desperdicios de piña es rico en polisacáridos diferentes los cuales la bacteria los asimila mejor. Por otro lado, el rendimiento obtenido en el caso de estudio no es el más elevado dentro de los estudios expresados en la tabla anterior, éste se obtiene mediante un tanque agitado en continuo y tiene una tasa de producción de 0,95 g/L·h. Sin embargo, el rendimiento de 0,42 g/L·h es el más elevado dentro de todos los procedimientos Batch expresados en la Tabla 24 por lo que representa un excelente rendimiento frente al resto.

### 5.3. Sistemas de separación y purificación

El sistema de separación y purificación de la celulosa bacteriana es esencial para el procesado del producto obtenido de los fermentadores. La CB obtenida es una masa gelatinosa sólida que representa una pequeña parte del volumen total del medio de cultivo. Al ser un sólido se ha decidido separarlo del medio de cultivo, como se menciona anteriormente, mediante el drenaje y la colocación de un colador simplex el cual consta de una reja interna donde quedará concentrada la celulosa bacteriana y dejará pasar todo residuo líquido.

Como primer paso, la CB se extraerá del colador una vez drenado todo el fermentador y pasará a un baño de agua destilada para limpiar toda su superficie de cualquier impregnación del medio de cultivo. Posteriormente, se realizará una purificación con NaOH a 30°C de la misma manera que el baño anterior, esto es con motivo de eliminar toda célula de *G. xylinus* remanente en la superficie del producto. Estudios mencionan que la purificación se debe de realizar con hidróxido de sodio hirviendo durante más de 3 horas pero al ser un químico irritante y corrosivo se decide utilizar un método más seguro. Después de este procedimiento, estos residuos se neutralizarán con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para poder eliminarlos de manera correcta. Como siguiente paso, se realizará un nuevo baño de agua destilada y finalmente, se introducirá a un horno de secado a 80°C por 8 horas para obtener un producto seco y poderlo empaquetar.



## 5.4. Plan de seguridad y operaciones

Ante todo, la seguridad de la planta debe abarcar todos los procedimientos realizados con el fin de minimizar y prevenir accidentes y riesgos laborales. Todos los operarios involucrados en el proceso deben de estar propiamente protegidos con bata que cubra la piel sobre polvo corrosivo, líquidos y salpicaduras leves. Así mismo, cada uno de ellos debe llevar obligatoriamente guantes, gafas y zapatos de seguridad para la protección de ojos, manos y pies.

En esta planta, la mayoría de máquinas no son altamente peligrosas y tampoco se tiene un manejo de materias peligrosas. Así mismo, todas la máquinas operan a temperaturas bajas o ambiente por excepción de la autoclave y el secador que operan a temperaturas de 121°C y 80°C, respectivamente. Por esta razón, en estos casos se debe de utilizar guantes para alta temperatura. Por otro lado, todas las máquinas se encontrarán a un nivel suficiente para su total manejo sin el uso de elementos elevados por excepción de los fermentadores que tendrán 2 metros de altura por lo que en este caso, se tendrá que utilizar una escalera o plataforma para la manipulación total del equipo cuando sea necesario.

El plan de operaciones de la planta piloto intentará ser óptimo para lograr la mayor producción posible, reducir tiempos muertos y costos. Como se ha mencionado anteriormente, la producción de CB se divide en tres grandes pasos: Preparación previa, Fermentación y Preparación posterior. En la Tabla 25 se observan las actividades de cada paso así como el tiempo necesario y la máquina que se utiliza.

Paso	Actividad	Tiempo necesario	Máquina
<b>Preparación Previa</b>	Trituración de desperdicios de piña	60 min	Triturador
	Mezclar para obtención medio de cultivo	5 min	Mezclador
	Esterilización	15 min	Autoclave
	Refrigeración	30 min	Enfriador
<b>Fermentación</b>	Producción CB	48 horas	Reactor <i>Airlift</i>
<b>Preparación posterior</b>	Vaciado de Reactor	5 min	Desagüe
	Primer Baño con agua destilada	15 min	Manual
	Neutralización con Hidróxido de sodio	15 min	Manual
	Segundo Baño con agua destilada	15 min	Manual
	Secado	8h min	Secador
	Empaquetado	15 min	Manual

Tabla 25: Operaciones principales para la producción de CB

A continuación, se presenta un diagrama de Roy en la Figura 66 para ilustrar el ciclo de vida de la producción, el tiempo de cada etapa y las precedencias de cada actividad. Se le llama actividad "A" a la preparación previa, "B" a la fermentación y "C" a la preparación posterior. El tiempo total de producción de cada lote será de 2 días con 10 horas y 10 minutos.

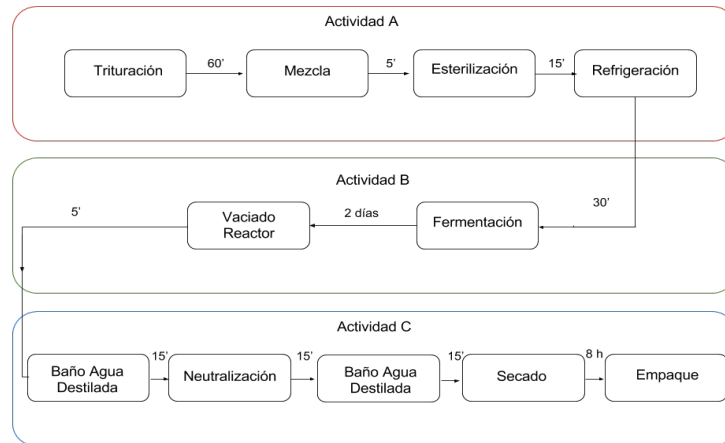


Figura 66: Diagrama de Roy de producción de CB

Con relación al plan de operaciones, éste será de la siguiente manera: en primer lugar se triturará los suficientes kilos de desperdicios piña para producir un mínimo de 150 litros de líquido los cuales serán medidos con los barriles y se filtrarán mediante coladores industriales; por consiguiente se realizará la mezcla con los demás componentes del medio de cultivo por cinco minutos con la ayuda del mezclador y dentro del barril; a continuación se introducirá la mezcla a la autoclave para su posterior enfriado en el enfriador por 30 minutos. Finalmente, únicamente 135 litros de esa mezcla se introducirá al vertedero la cual permanecerá allí para que los operarios de la planta 0 aperturen las válvulas correspondientes para el llenado del reactor 1. Al mismo tiempo que se está realizando esta operación, los 15 litros restantes se mezclarán con *G. xylinus* para la creación de inóculo y posteriormente se realiza el mismo paso de llenado al mismo reactor.

Una vez el reactor lleno, se medirán los parámetros de pH y volumen y se activará la entrada de aire para poder iniciar con la fermentación. Cada 5 horas se hará una medida de pH y temperatura para vigilar que la operación se esté realizando dentro de los parámetros correctos. Cuando hayan transcurrido 48 horas, se realizará el vaciado del reactor para la recolección de CB la cual pasará por el post-procesado que incluye dos baños con agua destilada y una neutralización con NaOH. Como último paso, se introducirá la celulosa obtenida al secador por 8 horas para su posterior empaquetado.

Al tener tres reactores, se realizará este procedimiento entero por triplicado y además en paralelo. Para optimizar recursos humanos y de máquinas se seguirá el horario ilustrado en la Figura 67 para la producción utilizando los tres reactores en el cual se alternan las actividades. Así mismo tal como se expresa en la Tabla 25 los tiempos de cada actividad, se agruparán en seis grupos que son: la trituración con un tiempo de 60 minutos; pre-procesado la cual incluye la esterilización, refrigeración y mezclado lo cual dura el mismo tiempo que el grupo anterior; la fermentación con 48 horas de duración; el post-procesado que se agrupan los tres baños con una duración de 60 minutos; y finalmente el secado que dura 8 horas.

Cabe mencionar que la Figura 67 contiene 8 días debido a que el “Día 1” es el día que se iniciarían las actividades por primera vez o después de haber puesto en alto la producción debido a mantenimiento o periodo vacacional. Mientras la planta no se detenga, el “Día 8”

será considerado como el primer día de la semana y el resto se mantendrán de la misma manera.

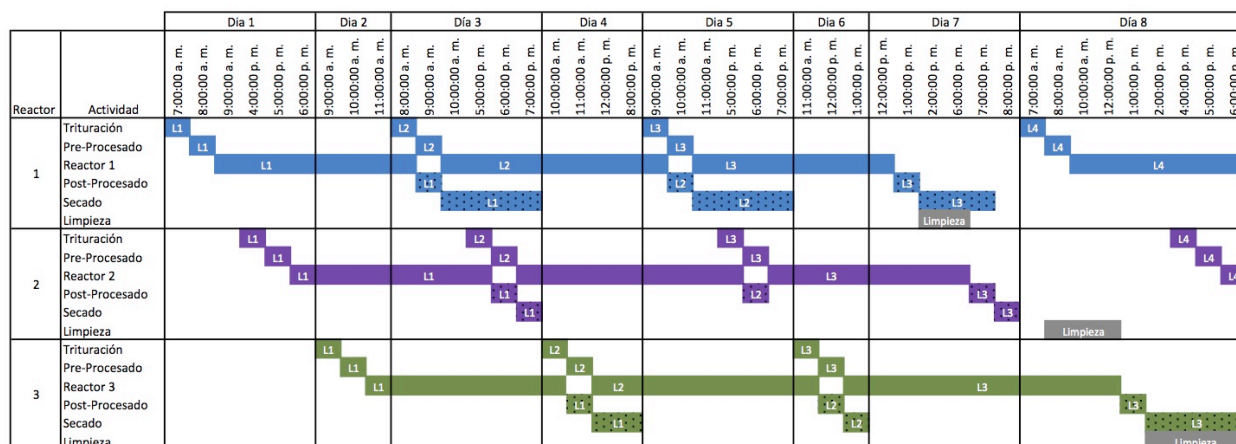


Figura 67: Calendario de actividades de la planta por día

En el proceso de fabricación de la CB, cada día de la semana se realizará una actividad distinta y se repetirá de la misma manera cada semana. En la Tabla 26 se explican las actividades que se realizan cada día, su duración y su horario. Se utiliza la siguiente nomenclatura: Trituración (T); Pre-procesado (Pre); Inicio Reactor (IR); Vaciado Reactor (VR); Post-procesado (Post); Secado (S); y Limpieza (L). Se observa, que los días con menos actividad es el día 2 y 6, lo cual los hace ideales para ser los días de descanso para la mayoría de operarios. El primer día de la semana se llama “Día 8” por la razón antes mencionada.

<b>“Día 8”</b>	07:00h – T 08:00h – Pre L Reactor 2 (4h) 09:00h – IR 1 12:00h – VR 3 (3’) – Post	13:00h – S CB de Reactor 3 L Reactor 3 (4h) 16:00h – T 17:00h – Pre 18:00h – IR 2
<b>Día 2</b>	09:00h – T 10:00h – Pre	11:00h – IR 3
<b>Día 3</b>	08:00h – T 09:00h – Pre VR 1 (3’) 09:05h – Post 10:00h – IR 1 17:00h – T	18:00h – Pre – VR 2 18:05h – Post 19:00h – IR 2 19:05h – S CB de Reactor 2
<b>Día 4</b>	10:00h – T 11:00h – Pre VR 3 11:05h – Post	12:00h – IR 3 12:05h – S CB de Reactor 3
<b>Día 5</b>	09:00h – T 10:00h – Pre VR 1 10:05h – Post 11:05h – S CB de Reactor 1 – IR 1 17:00h – T	19:00h – Pre VR 2 19:05h – Post 20:00h – IR 2 20:05h – S CB de Reactor 2
<b>Día 6</b>	11:00h – T 12:00h – Pre VR 3 12:05h – Post	13:05h – S CB de Reactor 3
<b>Día 7</b>	11:00h – VR 1 11:05h – Post L Reactor 1 12:05h – S CB de Reactor 1	20:00h – VR 2 20:05h – Post 21:00h – S CB de Reactor 2

Tabla 26: Horario de actividades por día

Debido a que los reactores no necesitan una limpieza posterior a cada lote, la limpieza de los reactores y maquinaria en general, se realizarán una vez por semana con una duración de 4 horas. Durante este tiempo, se realizarán también operaciones de mantenimiento, de ser necesarias, ya sea preventivos o correctivos. La limpieza se realizará con agua destilada en todos los recipientes que entren en contacto con las mezclas, en ningún momento se deberá utilizar algún detergente ya que restos de éste podría modificar el pH de mezclas posteriores y eso afectaría sustancialmente los resultados.

El mantenimiento de las máquinas involucradas es un elemento básico para mantener las condiciones óptimas del sistema. Como se menciona, se tendrán que realizar operaciones de mantenimiento preventivo cada semana cuando la producción esté detenida, que incluirá una verificación del funcionamiento general, lubricación de válvulas, calibración de sensores, limpieza general anti-corrosiva general de equipos y revisión de piezas de cambio frecuente. En caso de tener algún problema de funcionamiento o de necesidad de refacción, se tendrá que realizar un mantenimiento correctivo que podrá significar un paro en la producción lo cual podría afectar el ingreso económico de la planta. Con fin de agilizar los mantenimientos correctivos, será necesario tener en almacén recambios de piezas que el fabricante de cada equipo recomiende. Así mismo, al tener dos semanas al año donde la producción está detenida por periodo vacacional, se podría aprovechar para programar mantenimientos correctivos necesarios y así no afectar a la producción.

## 6. Estudio económico

El estudio económico es una parte vital de este proyecto ya que la producción de CB a nivel industrial no se ha desarrollado principalmente por el coste tan alto de inversión y bajos rendimientos. Por esta razón se busca tener una producción alta con unos costes de operación e inversión bajos.

La inversión del capital se divide en capital fijo o inicial y capital de trabajo. El primero tiene como objeto el diseño de la planta, la adquisición y montaje de los equipos necesarios, la construcción civil y la puesta en marcha de la misma. Una vez construida la planta, es necesario un capital adicional para hacer frente a las compras de las materias primas, materiales fungibles de la planta, servicios, pagar salarios, seguridad social y operaciones de mantenimiento. La suma de capital inicial y el capital de trabajo se conoce como inversión total de capital o inversión total (52).

Para la estimación de capital fijo, se realizará un estudio que según la Asociación Americana de Costos (AACE) tiene un error entre el 25 y 50%. Dentro del estudio se realizará un estimado del presupuesto del diseño ingenieril, equipamiento e instalación para conocer el total de activo fijo (52).

El método factorial de la estimación de costo se atribuye a Lang (1949). El costo fijo de un proyecto está dado por la función del total del costo de equipamiento por la Ecuación (7).

$$C_f = f_L \cdot C_e$$

*Ecuación (7)*

donde  $C_f$  = costo capital fijo

$C_e$  = total del costo de todos los componentes del equipamiento de la planta: tanques de almacenamiento, columnas, intercambiadores de calor, etc.

$f_L$  = el factor de Lang, el cual depende del tipo de proceso.

$f_L = 3,1$  para plantas que procesan sólidos

$f_L = 4,7$  para plantas que procesan fluidos

$f_L = 3,6$  para plantas que procesan fluidos y sólidos

Los valores del factor de Lang deben de ser utilizados como una referencia pero el factor se deriva mejor de los propios cálculos de la organización o proyecto. La Ecuación (7) puede ser utilizada para un estimado rápido en etapas tempranas del diseño del proyecto. Para realizar una estimación más precisa, los factores de coste que están compuesto en el “factor de Lang” están considerados individualmente. Los elementos de coste directo que están considerados en la construcción de una planta, además del coste de los equipos son los expresados a continuación (53).

## Costes directos

1. Equipo de construcción, incluidas las fundaciones y el trabajo estructural menor
2. Tubería, incluyendo aislamiento y pintura
3. Instalación eléctrica, potencia e iluminación
4. Los instrumentos de sala de control y locales
5. Proceso de edificación y estructuras
6. Edificios auxiliares, oficinas, edificios de laboratorios y talleres
7. Almacén de materias primas y producto terminado
8. Utilidades (Servicios), suministro de vapor, agua, aire, extinción de incendios
9. Terreno y preparación del sitio

La contribución de cada uno de estos elementos al coste de capital total se calcula multiplicando el total del coste de los equipos comprados por un factor apropiado. Al igual que con el factor de Lang básico, estos factores tienen mejor precisión gracias a los datos históricos para procesos similares. Los valores típicos para los factores derivan de diferentes fuentes e investigaciones tal como Happle y Jordan en 1995, Garrett en 1989 y Guthrie en 1974 que divide los costes en las partes de material y de mano de obra y da factores independientes para cada elemento (53).

La exactitud y fiabilidad de una estimación puede mejorarse dividiendo el proceso en subunidades y utilizando factores que dependan en la función de cada subunidad. Los valores típicos del factor para los componentes del costo capital se dan en la Tabla 27. Estos pueden ser utilizados para hacer una estimación aproximada del costo capital a partir de datos del costo de equipos publicados en literatura (53)

Elemento	Tipo de proceso		
	Fluidos	Fluido-sólido	Sólidos
1. Coste total de equipos comprados ( $C_{EC}$ )	$C_{EC}$	$C_{EC}$	$C_{EC}$
$f_1$ Equipo de construcción	0,4	0,45	0,5
$f_2$ Tubería	0,70	0,45	0,20
$f_3$ Instrumentación	0,20	0,15	0,10
$f_4$ Instalaciones eléctricas	0,10	0,10	0,10
$f_5$ Edificios y procesos	0,15	0,10	0,05
$f_6$ Utilidades	0,50	0,45	0,25
$f_7$ Almacenes	0,15	0,20	0,25
$f_8$ Desarrollo de terreno	0,05	0,05	0,05
$f_9$ Edificios auxiliares	0,15	0,20	0,30
2. Coste total de planta física ( $C_{PF}$ )			
$C_{PF} = C_{EC} \cdot (1 + f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_9)$			
$f_{10}$ Diseño e ingeniería	0,30	0,15	0,10
$f_{11}$ Honorarios de contratista	0,05	0,05	0,05
$f_{12}$ Asignación de contingencia	0,10	0,10	0,10
Capital fijo = $C_{PF} \cdot (1 + f_{10} + f_{11} + f_{12})$			

Tabla 27: Factores típicos para la estimación del coste de capital fijo de un proyecto (53)

Además de los costos directos de la compra e instalación de equipos pesados, el costo de capital de un proyecto incluirá los costes indirectos que se enumeran a continuación, los cuales pueden estimarse como una función de los costes directos.

#### Costes indirectos

1. Costo de diseño e ingeniería: incluye el diseño, la compra, la adquisición y la supervisión de la construcción. Generalmente representa entre un 10 y 30% del total de los costos directos
2. Honorarios del contratista: si un contratista se emplea, sus honorarios serían considerados como costo de capital total y su rango es entre un 5 y 10% del total de los costos directos
3. Asignación de contingencia: se trata de una prestación incorporada en la estimación del costo de capital para cubrir circunstancias imprevistas tal como conflictos de trabajo, errores de diseño, adversidad de clima, entre otros), por lo general representa entre un 5 y 10% del total de los costos directos

Los costes indirectos también están incluidos en la Tabla 27. Finalmente, el capital fijo requerido para la provisión de servicios públicos y otros servicios de la planta dependerá de si se construye en un terreno nuevo o si la planta se construirá en un sitio existente y hará uso de instalaciones existentes (53).

## 6.1. Caso particular

En el caso de estudio, será una planta de fluidos-sólidos debido a la materia prima recibida en sólido para su posterior trituración para conseguir medio líquido y la obtención de celulosa sólida. Por otro lado, se realiza la estimación de equipamiento de la planta para obtener el coste de equipos comprados ( $C_{EC}$ ). Esta estimación se encuentra expresada en Tabla 28 donde se obtiene un total de 172.687,60€.

Equipo	Fabricante	Cantidad	Coste unitario	Coste total
Barril de acero 55 galones	Grainger	5	140€	700€
Transportín de Barril	Warrior	3	328€	984€
Válvula de compuerta	Spears	7	264€	1.848€
Reactor Airlift	BioReactor Science®	3	52.200€	156.600€
Procesador de desperdicios	IMC	1	2.792€	2.792€
Mezclador de Barriles	Mixer Direct	2	1.312€	2.624€
Autoclave	Bluestone	1	894€	894€
Enfriador	FIC	1	2.710€	2.710€
Colador Simplex	Hayward	1	1.196€	1.196€
Válvula de bola	Georg Fisher	1	80€	80€
Horno de Secado	Terlab	1	2.170€	2.170€
Bandejas de lavado de 9 L	Gastronorm	10	15,26€	152,60€
<b>Estimación equipos comprados (<math>C_{EC}</math>)</b>				<b>172.687,60€</b>

Tabla 28: Coste de equipos necesarios para la obtención de CB



Una vez que se tiene la estimación de equipos comprados ( $C_{EC}$ ) se realiza un ajuste a los factores típicos del proceso fluido-sólido de la Tabla 27 para adaptarlos a este proyecto y tener una estimación aún más precisa:

- El valor de la tubería cambia de 0,45 a 0,25 ya que la tubería será mínima por ser un proceso Batch
- El valor de edificios auxiliares disminuirá de 0,20 a 0,10 ya que no se tendrá edificios auxiliares
- El valor de almacenes disminuirá de 0,20 a 0,15 debido que el almacén de producto terminado será proporcionalmente menor debido al bajo rendimiento de producción

Una vez hechas estas correcciones, quedan como factores de este proyecto los expresados en la Tabla 29 y el cálculo de coste total de planta física ( $C_{PF}$ ) se puede realizar en función del coste de equipos comprador ( $C_{EC}$ ) calculado anteriormente.

Coste total de equipos comprados ( $C_{EC}$ )		172.687€
<b>f<sub>1</sub> Equipo de construcción</b>	0,45	$C_{PF} = C_{EC} \cdot (1 + \sum f_n)$ $C_{PF} = 172.687€ \cdot 3,3$ <b><math>C_{PF} = 569.870€</math></b>
<b>f<sub>2</sub> Tubería</b>	0,25	
<b>f<sub>3</sub> Instrumentación</b>	0,15	
<b>f<sub>4</sub> Instalaciones eléctricas</b>	0,10	
<b>f<sub>5</sub> Edificios y procesos</b>	0,60	
<b>f<sub>6</sub> Utilidades</b>	0,45	
<b>f<sub>7</sub> Almacenes</b>	0,15	
<b>f<sub>8</sub> Desarrollo de Terreno</b>	0,05	
<b>f<sub>9</sub> Edificios auxiliares</b>	0,10	
<b><math>\sum f_n</math></b>	<b>2,3</b>	

Tabla 29: Cálculo de coste total de planta física con factores corregidos

Una vez realizado este cálculo se realiza la estimación del capital fijo con la ecuación expresada en la Tabla 28, donde se obtiene un resultado indicado en la Ecuación (8) dando como total la cantidad de 740.831€. En la Tabla 30 se expresa el desglose de costo directo e indirecto.

$$Capital\ fijo = C_{PF} \cdot (1 + f_{10} + f_{11} + f_{12})$$

$$Capital\ fijo = 569.870 \cdot (1 + 0,15 + 0,05 + 0,10) = 740.831€$$

Ecuación (8)

Concepto	Coste
<b>Coste equipos</b>	172.687 €
<b>Coste directo</b>	397.183 €
<b>Coste indirecto</b>	170.961 €
<b>CAPITAL FIJO</b>	<b>740.831 €</b>

Tabla 30: Desglose de costos

Con el fin de comprobar estos resultados, se realizará la estimación del coste de diseño e ingeniería mediante otro método para efectuar un contraste. El método alternativo se basa en

realizar un listado de actividades realizado por el ingeniero de diseño con un tiempo estimado de realización y establecer el costo por hora trabajada es de 65€. En la Tabla 31 se observa el cálculo del presupuesto de diseño e ingeniería que se contrastará posteriormente con el factor ( $f_{10}$ ) del método de Lang.

Concepto	Horas Invertidas	Coste total (€)
<b>Búsqueda de información</b>	120 h	7.800
<b>Diseño general de planta</b>	200 h	13.000
<b>Diagrama PI&amp;D</b>	100 h	6.500
<b>Plano de implementación</b>	130 h	8.450
<b>Memoria técnica</b>	80 h	5.200
<b>Material Necesario</b>		1.000
<b>Total</b>	<b>390 h</b>	<b>€ 41.950</b>

Tabla 31: Presupuesto de diseño de ingeniería por método alternativo

Mediante el método de Lang, el factor  $f_{10}$  que corresponde al diseño de ingeniería de la planta corresponde a un 15% del coste total de la planta física ( $C_{PF}$ ). Por lo que da una estimación de coste de diseño de 85.480€ y al realizar el contraste del resultado obtenido en la Tabla 31 se observa un error del 50%, el cual es adecuado para esta estimación según la AACE. El error se deriva del alto costo que representa los reactores frente a los demás componentes aunado que la instalación no sea tan costosa.

Como se mencionó anteriormente, para tener un estimado del capital de inversión se debe de tener el capital fijo y el capital de trabajo. El capital de trabajo es el capital que se necesita para hacer frente a los gastos que representa tener la fábrica en funcionamiento, los cuales se enumeran en la Tabla 32.

Elemento	Valores típicos
<b>Gastos variables (A):</b>	
<b>Materias primas</b>	Parámetros
<b>Materias diversas</b>	10% del costo de mantenimiento
<b>Servicios generales</b>	Parámetros
<b>Envío y embalaje</b>	Normalmente despreciable
<b>Gastos fijos (B):</b>	
<b>Mantenimiento</b>	5-10% del costo fijo
<b>Mano de obra operativa</b>	Salario de operadores
<b>Costos de laboratorio</b>	22% del costo de mano de obra
<b>Supervisión</b>	20% del costo de mano de obra
<b>Gastos generales de planta</b>	50% del costo de mano de obra
<b>Gastos financieros (intereses)</b>	10% del costo fijo
<b>Seguro</b>	1% del costo fijo
<b>Impuestos locales</b>	2% del capital fijo
<b>COSTO TOTAL ANUAL DE PRODUCCIÓN</b>	Suma de A y B

Tabla 32: Costo total anual de producción (53)

Los parámetros que hemos de definir para poder calcular el costo total anual de producción son el costo de la materia prima, servicios generales, número de operadores y su salario. En primer lugar, se definirá el costo anual de la materia prima con el coste unitario de cada elemento y posteriormente multiplicando éste por el consumo anual como se observa en Tabla 33, se tiene en cuenta que se realizan 450 lotes.

Materia prima	Unidad	Costo unitario	Consumo para un lote	Consumo Anual	Costo anual
<b>Desperdicio de piña</b>	Saco 25 kg	-	156,75 kg	70,5 ton	-
<b>Extracto de levadura</b>	Bote 2,5 kg	312€	900 gramos	405 kg	€ 50.544
<b>Bactopepton</b>	Bote 500 g	85€	223,5 gramos	100,5 kg	€ 17.098
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Saco 25 kg	80 €	162 gramos	73 kg	€ 235
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Saco 1 kg	5€	9 gramos	4 kg	€ 20
<b>NaOH</b>	Saco 25 kg	32€	120 gramos	54 kg	€ 69
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Bote 18 L	142€	3 litros	1350 L	€ 10.650
<b>Agua destilada</b>	Bote 20 L	28€	6 litros	2.700 L	€ 3.780
<b>G.xylinus</b>	Donación	-	3 gramos	1,35 kg	-
<b>TOTAL de materias primas</b>				<b>82.396€</b>	

Tabla 33: Costeo de materia prima anual

Los operarios necesarios para esta planta piloto serán tres fijos con una jornada de 8 horas y dos operarios más que se contratarán por hora cuando se realicen operaciones de limpieza y para el post-procesado de la CB. El salario para este tipo de trabajo está cotizado por 1.400 € al mes si es de contrato indefinido y por un contrato temporal se cotiza en 40€ la hora. Por lo que en el gasto de mano de obra operativa tendrá un costo aproximado de **5.400€** al mes.

A continuación se calcula el costo de los servicios generales con los precios públicos en donde se incluye el consumo de luz, de agua y suministro de oxígeno. En el estudio realizado por Zuber et al. (54) se calcula que el consumo aproximado para el funcionamiento de un reactor *airlift* de 1000 litros es de 3 kW por lo que se realiza una extrapolación para obtener el consumo para el reactor de esta planta. Al tener un reactor airlift de 200 litros, se tendrá un consumo aproximado de 0,6 kW.

Para la poder obtener el consumo en kW·h por año se multiplica el consumo por las horas de funcionamiento a la semana y posteriormente por las 50 semanas al año de funcionamiento del aparato, este cálculo se resumen en Tabla 35. Posteriormente se calcula el costo que implica con un precio promedio a 5 años, el cual se realiza utilizando el costo de 2016 del suministro eléctrico y se supone que tendrá una subida anual del 3%. El costo actualizado de 2016 es de 0,14755 €/kW·h por lo que según la Tabla 34 se tendrá un precio promedio de 0,156676 €/kW·h. Con el consumo anual eléctrico expresado en la Tabla 35 se tiene un costo anual en consumo eléctrico de **25.884,94 €**.

Precio* 2016	Precio* 2017	Precio* 2018	Precio* 2019	Precio* 2020	Media*
<b>0,14755</b>	0,15197	0,15653	0,16123	0,16606	0,15667

**\*Expresados en €/kW·h**

Tabla 34: Precio promedio consumo eléctrico

Equipo	Potencia	Horas de funcionamiento por semana	Consumo anual (kW·h)
<b>Reactores (3)</b>	1,8 kW	144 horas	12.960
<b>Procesador de alimentos</b>	0,55 kW	9 horas	247
<b>Mezclador</b>	0,745 kW	0,75 horas	27,94
<b>Autoclave</b>	6 kW	2,25 horas	675
<b>Enfriador</b>	23 kW	4,5 horas	5.175
<b>Horno secador</b>	1,5 kW	72 horas	5.400
<b>Iluminación</b>	0,5 kW	56 horas	1.400
<b>TOTAL</b>			<b>25.884,94</b>

Tabla 35: Resumen de consumos anuales de equipos

Como siguiente paso se debe de calcular el consumo de agua al año, en esta planta el único aparato que tiene consumo de agua es el procesador de alimentos pero también se debe de considerar un consumo para operaciones de limpieza e higiene. El procesador de alimentos consume aproximadamente 13 litros de agua por minuto por lo que si trabaja 9 horas a la semana tendrá un consumo semanal de 7.020 litros. Por otro lado, de operaciones de limpieza e higiene se calcula un consumo diario de 80 litros por cada empleado por lo que si se tiene un aproximado de 8 empleados en la planta, se tendrá un consumo diario de 640 litros. En la Tabla 36 se resume el consumo de agua anual donde también se aplica un precio con el mismo procedimiento del consumo eléctrico. Considerando un precio de 2,24 €/m<sup>3</sup> publicado por la Agencia Catalana del Agua en 2016, se tiene un precio promedio de 2,37 €/m<sup>3</sup>

Concepto	Consumo semanal	Coste anual
<b>Procesador de alimentos</b>	7,02 m <sup>3</sup>	832€
<b>Consumo limpieza e higiene</b>	4,48 m <sup>3</sup>	531€
<b>TOTAL</b>	<b>11,50 m<sup>3</sup></b>	<b>1.363€</b>

Tabla 36: Consumo y coste anual de agua

Por simplificación de cálculos se estimará un coste del servicio del suministro de oxígeno de un 10% del coste total del resto de los servicios teniendo como resultado del coste de servicios:

Coste electricidad – 25.884,94 € /año

Coste Agua – 1.363 €/año

Coste Oxígeno – 2.725 €/año

**TOTAL de servicios – 29.973 €/ año**

Una vez que se tienen los cálculos del coste de servicios, mano de obra de operarios y materia prima podemos realizar el cálculo de coste total anual de producción mencionado en la Tabla 32, el cual se realiza en la Tabla 37.

Elemento	Obtención	Coste Anual
<b>Gastos variables :</b>		
<b>Materias primas</b>	Cálculo previo	€ 82.395,84
<b>Materias diversas</b>	10% mantenimiento	€ 7.408,31
<b>Servicios generales</b>	Cálculo previo	€ 29.973
<b>Envío y embalaje</b>	Despreciable	€ -
<b>Gastos fijos :</b>		
<b>Mantenimiento</b>	10% costo fijo	€ 74.083,10
<b>Mano de obra operativa</b>	Cálculo previo	€ 64.800
<b>Costos de laboratorio</b>	22% mano de obra	€ 14.256
<b>Supervisión</b>	20% de mano de obra	€ 12.960
<b>Gastos generales de planta</b>	50% de mano de obra	€ 32.400
<b>Gastos financieros</b>	10% del capital fijo	€ 74.083,10
<b>Seguro</b>	1% del capital fijo	€ 7.408,31
<b>Impuestos locales</b>	2% del capital fijo	€ 14.816,62
<b>COSTO TOTAL ANUAL DE PRODUCCIÓN</b>		<b>€ 414.584,28</b>

Tabla 37: Coste anual de producción

Una vez obtenido el coste total de producción se puede calcular el costo de producción por kilo de CB con la Ecuación 9, en la cual se obtienen 307 € por cada kilogramo.

$$\text{Costo producción} = \frac{\text{Costo total de producción anual (€)}}{\text{Producción anual de CB (kg)}} = 307 \text{ €/kg}$$

Ecuación (9)

## 6.2. Viabilidad del proyecto

Una vez realizados los cálculos para obtener la inversión inicial y el coste de producción se puede estimar el precio de venta de la CB para poder tener una recuperación de la inversión. El precio de venta público (PVP) se aproxima sobre un 35% arriba del costo de producción lo cual representa 410 € por cada kilogramo. A partir de esto, en la Tabla 38 se muestra la aproximación de ingresos anual de la planta.

Concepto	Ingreso unitario	Ingresos anuales
<b>1.350 kg de CB</b>	415 € / kg	560.250€

Tabla 38: Ingresos de la planta

Es necesario estudiar el tiempo de recuperación para poder realizar una evaluación adecuada de la viabilidad del proyecto. El tiempo de recuperación es el tiempo necesario después del inicio del proyecto para pagar la inversión inicial con los ingresos, es un criterio útil para juzgar los proyectos que tienen una vida corta, o cuando el capital sólo está disponible por un corto tiempo. Por lo general, un tiempo de amortización de 2 a 6 años se podría esperar para este tipo de proyectos y no tiene en cuenta el rendimiento del proyecto después del periodo de recuperación. Por consiguiente, se realizará la evaluación de la inversión con el valor actualizado neto a una tasa de interés del 20% en un periodo de 6 años resumido en la Tabla 39.

	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5	Año 6
<b>Inversión</b>	€ 740.831	€ -	€ -	€ -	€ -	€ -	€ -
<b>Ingresos</b>	€ -	€ 560.250	€ 560.250	€ 560.250	€ 560.250	€ 560.250	€ 560.250
<b>Gastos</b>	€ -	€ 414.584	€ 414.584	€ 414.584	€ 414.584	€ 414.584	€ 414.584
<b>Flujo de Tesorería</b>	-€ 740.831	€ 145.666	€ 145.666	€ 145.666	€ 145.666	€ 145.666	€ 145.666
<b>Flujo de Tesorería Actualizado</b>	-€ 740.831	-€ 595.165	-€ 449.500	-€ 303.834	-€ 158.168	-€ 12.502	€ 133.163
	<b>TIR 4,94%</b>			<b>VAN de periodo € 44.596,13</b>			

Tabla 39: Análisis de inversión y tiempo de recuperación

Como se puede observar, el VAN a 6 años es positivo por lo tanto se recupera la inversión con una tasa de interés del 20%. Inversamente, para tener una recuperación en 6 años el TIR indica que se debe de tener una tasa de interés del 4,94% anual. Mediante estos números el proyecto es viable y rentable a los 6 años de su inicio. Por otro lado, estudiaremos el precio de venta actual de la celulosa vegetal y pulpa de celulosa que se vende por tonelada y para poder compararlo con el precio de venta propuesto de esta planta.

La empresa Sigma-Aldrich®, multinacional química, comercializa diferentes tipos de celulosa desde acetato de celulosa hasta composites con celulosa como carboxilmetil celulosa. Esta empresa comercializa la celulosa con un CAS9004-34-6 en un precio de 173 € por cada kilogramo, en cambio el carboxilmetil celulosa tiene un precio de 582,80€ por cada kilogramo. Otra empresa química llamada Avicel®, también fabrica la celulosa pero la distribuyen como microcristalina y ésta tiene un precio de 376,80€ por cada kilogramo. Con respecto a estos precios, la CB producida en la planta piloto de estudio que tiene un precio de venta de 415 € el kilogramo lo que representa un precio dentro de los rangos actuales del mercado. Por el contrario, la celulosa vegetal se encuentra en un precio de 790 € por cada tonelada (55), es decir 0,79 €/kg, lo que hace que la CB quede completamente fuera de mercado y por eso que actualmente no tenga una alta demanda ni sea de interés industrial (56) (57) .

El precio de la celulosa vegetal está incrementando anualmente debido a la alta demanda que existe actualmente para todas las aplicaciones que tiene. En la Figura 68 se ilustra el incremento del precio de la celulosa obtenida de los árboles en los últimos 3 años, la cual ha incrementado un 30% (55). Se podría predecir que este precio seguirá incrementado debido a la progresiva disminución de población de árboles, el continuo crecimiento de demanda de celulosa y el incremento de normativas y leyes para el cuidado ambiental. Por estos motivos, podría ser una excelente alternativa la producción de CB ya que además de tener mejores propiedades que la celulosa vegetal, su obtención tiene mínimo impacto ambiental.

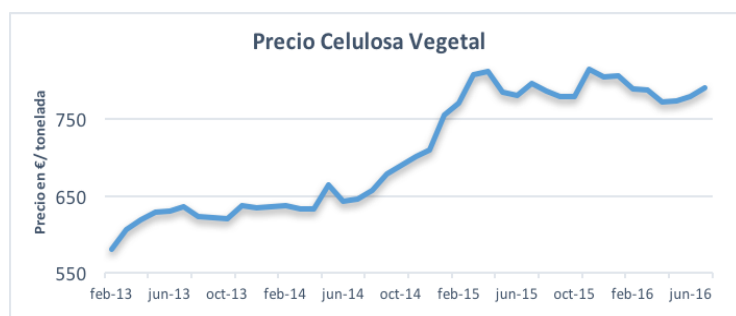


Figura 68: Precios de celulosa vegetal de Febrero 2013 a Junio 2016 (55)

## 7. Impacto Ambiental

Hoy en día es muy importante tener muy presente el cuidado del medio ambiente sobre todo en las industrias ya que son la mayor aportación a la contaminación que se tiene hoy en día. Debido a esto, se estudiará el impacto ambiental que realiza la planta con residuos generados, emisión de CO<sub>2</sub> y generación de ruidos. Por otro lado, este impacto que realiza la instalación se contrastará con el beneficio que aportará a la sociedad dado que es un método alternativo a la tala de árboles.

En primer lugar, los residuos generados de la planta serán: el medio de cultivo remanente una vez realizada la fermentación, hidróxido de sodio después de la purificación, sacos y recipientes de la materia prima y agua residual. El medio de cultivo residual consistirá básicamente en desperdicios de piña con un pH de 4,5 por lo que se tendrá que neutralizar con ayuda de hidróxido de sodio para poder desecharse. El desecho del residuo del medio de cultivo será una fracción porque se pretende reutilizar éste como inóculo de lotes siguientes. Por otro lado, al ser un producto orgánico rico en monómeros y azúcares será fácilmente digerido por bacterias en el medio. El hidróxido de sodio utilizado en la purificación, se neutralizará con ácido sulfúrico para poder desecharlo sin tener repercusiones en el medio ambiente. Respecto a los sacos y recipientes donde se recibe la materia prima si se desechan contaminarán en forma de generación de basura aunque son inertes y no riesgosos, por este motivo se deberían reutilizar para resurtir esa mercancía. Finalmente, se tendrá un residuo de agua empleada para la limpieza general de la planta e higiene del personal. Este residuo será de aproximadamente 55 m<sup>3</sup> anuales lo cual contribuye al consumo de agua mundial aunque no genera ninguna contaminación negativa. Sin embargo, aporta cierto cabal a las aguas negras, por lo que se necesitará más energía en las estaciones depuradoras para limpiarla.

Otro aspecto muy importante es la emisión de CO<sub>2</sub> debido que cada vez existen más normativas que limitan y regulan estas emisiones. Éstas provienen de las fuentes de energía utilizadas, que en esta planta únicamente será por consumo eléctrico, donde anualmente se utilizarán 25.884 kW·h. Según la Comisión Europea por cada kW·h consumido se generan 0,65 kg de CO<sub>2</sub>, por lo que en la planta piloto de CB se generarán 16,8 toneladas de CO<sub>2</sub> anualmente, lo cual representa una cantidad mínima con la emisión anual de España que es de 224 millones de toneladas (58).

La generación de ruido es un contaminante que tiene limitaciones en la legislación y normativa en todas las instalaciones industriales. Conjuntamente se tiene que tener en cuenta la vibración, la cual es en función de la frecuencia de oscilación de las partes móviles de las maquinarias y motores y son medidas en decibeles (dB) tal como el ruido. Según la norma española, el nivel máximo de ruido en zona industria es de 80 dB a una distancia de un metro respecto a la fuente de ruido. En este caso, la maquinaria que realizaría un ruido significativo sería la trituradora de desperdicios por lo que se debe tener en cuenta especialmente este aparato para que no sobrepase los niveles máximos de ruido permisible.



Los múltiples beneficios de tener una planta de celulosa bacteriana podrían contrarrestar el impacto ambiental mínimo que conlleva antes descrito en comparación con la producción de celulosa vegetal actual. Para la obtención de celulosa vegetal, se requiere grandes cantidades de madera que proviene de árboles o algodón, lo cual representa un agotamiento importante de los recursos naturales. La deforestación importa un grave problema para el medio ambiente ya que genera erosión al suelo, extinción de hábitats naturales y el desbalance de la transformación que realizan los árboles de dióxido de carbono a oxígeno lo cual acrecienta el calentamiento global. Para contrarrestar este efecto, las empresas que se dedican a la tala de árboles tienen programas para reforestación pero esto también impacta en el uso de más suelo y agua para el crecimiento de nuevos árboles. Según la WWF, la pasada década se produjo una pérdida neta de superficie forestal de 93,9 millones de hectáreas (59) por lo que es necesario disminuir la deforestación considerablemente para no causar mayor daño al medio ambiente. De hecho, en la Figura 69 se observa el crecimiento de la deforestación desde el Siglo XIX, donde se puede deducir que ha ido aumentando conforme la población mundial y por ende, seguirá en aumento (60).

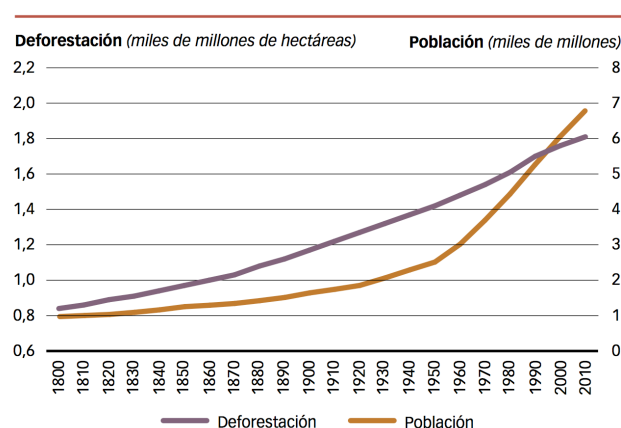


Figura 69: Población mundial y deforestación acumulada de 1800 a 2010 (60)

Por consiguiente, la celulosa fabricada por bacterias es una excelente alternativa para reducir el impacto ambiental tan negativo que tiene la producción de celulosa vegetal. Dentro de unos de sus beneficios se encuentra la creación de un producto con excelentes propiedades y aplicaciones; la disminución de tala de árboles; la disminución del uso de maquinaria necesaria para el transporte de madera y por consecuencia menos combustible utilizado. La planta de CB es una alternativa considerablemente más verde que la actual obtención de celulosa mediante madera y plantas.

## Conclusiones

La necesidad de crear productos innovadores con propiedades únicas tiene un crecimiento exponencial debido al progreso tecnológico e ingenieril que se vive en la sociedad actual. Por este motivo, investigadores científicos se enfocan en el desarrollo de bienes que den una aportación positiva a este progreso, como es la celulosa. Este producto tiene propiedades únicas y tiene un consumo muy elevado debido a que es fuente de la producción de papel, textiles y derivados. La celulosa bacteriana es un excelente sustituto de ésta ya que mejora sus propiedades además de ser un producto sustentable y renovable sin embargo, la fabricación de CB está limitada a sus condiciones de producción tan específicas y la baja rentabilidad de crear una planta.

La celulosa bacteriana es una alternativa atractiva de la celulosa obtenida a través de árboles y algodón debido a las propiedades de la CB que la superan en cuestión de cristalinidad, pureza, capacidad de retención de agua y estabilidad mecánica. Así mismo, representa un producto completamente sustentable y renovable ya que se produce a través de bacterias de obtención fácil y la producción de ésta representaría una disminución considerable de tala de árboles y cultivos de algodón. Por último, por la mejora de propiedades la CB tiene infinidad de aplicaciones a diferencia de la celulosa vegetal tal como en la industria médica, alimentaria, electrónica, textil e industrial.

La producción de CB no ha podido ser desarrollada plenamente debido al bajo rendimiento que se tiene y la elevada inversión que se tendría que realizar. En este proyecto, se concluye que la producción de celulosa es un proceso largo, de condiciones muy específicas y con bajos rendimientos. Así mismo, se calculó que para producir poco más de una tonelada anual se deben instalar tres reactores *airlift* con una capacidad total de 200 litros con un sistema Batch. Cada uno de ellos deberá de realizar tres lotes por semana con una producción de 3 kilogramos en cada lote. Al intentar diseñar una planta renovable y amigable con el medio ambiente, se consideró como medio de cultivo desperdicios de piña por ser ricos en polisacáridos y por la alta producción de éstos en la industria. Con este diseño se obtiene una producción de 1350 kilogramos anuales y una transformación del 24% de azúcares introducidos a la fermentación. Este grado de transformación es considerablemente bueno debido a que se encuentra dentro de los rangos normales para esta fermentación.

Por otro lado, la viabilidad económica ha sido el problema principal del desarrollo industrial de la celulosa bacteriana. Debido a esto, se consideró esencial el estudio económico de la planta, de la cual se estimó una inversión inicial de 730.000 € con un costo aproximado de gastos de producción de casi 400.000€. Posteriormente, se calculó el costo por kilogramo de CB con motivo de establecer un precio de venta al público, el cual se determinó en 388 € por cada kilogramo. Una vez obtenido este precio, se realizó un estudio de mercado de celulosa y se comprobó que el precio determinado en este proyecto se encuentra dentro de los rangos para celulosa obtenida artificialmente. Sin embargo, la celulosa vegetal tiene un precio actual muy por debajo del precio determinado por lo que hace que la venta de este producto sea mínima. El problema de la celulosa vegetal, aparte de no contar con las propiedades únicas de la CB, es que el precio va en continuo aumento por lo que en un futuro esta planta podría ser extremadamente útil y rentable.

## Agradecimientos

Antes que nada, me gustaría agradecer a mi tutor, Jordi Bou, que aceptó guiarme y asesorarme a pesar de las circunstancias. Gracias por creer en mí.

Quiero agradecer a mi madre y a mi hermano, que en todo momento me brindaron apoyo y palabras de aliento para poder continuar este proyecto.

A mi novio que siempre estuvo ahí, que sin él no hubiese tenido la motivación para realizar este trabajo.

Por último y muy especialmente, a mi padre que me lo dio todo y que aunque no haya visto la culminación de mi carrera, de la cual tenía mucha ilusión, sé que estaría completamente realizado y orgulloso de mí en todo momento.

## Bibliografía

1. **Callister, William D.** (1996) *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*. Bogotá : Reverté. ISBN 8429172548.
2. **Stupenengo, Franco.** (2011) *Materiales y materias primas: Materiales compuestos*. Buenos Aires : Instituto Nacional de Educación Tecnológica.
3. **Ballesteros, Maria Nuria Salán.** (2005) *Tecnología de proceso y transformación de materiales*. Barcelona : Edicions UPC. ISBN 848301789.
4. **Moreno, Ligia María Vélez.** (2008) *Materiales Industriales*. Medellín : Instituto Tecnológico Metropolitano.
5. *Técnicas de Fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión*. **Carreño Pineda, Luz, Caicedo Mesa, Luis Alfonso y Martínez Riascos, Carlos Arturo.** 16, Colombia : Universidad EAFIT, 2012, Vol. 8. ISSN:1794-9165.
6. **Fugelstad, Johanna.** (2008) *Cellulose Biosynthesis in Oomycetes*. Stockholm : KTH. ISBN 978-91-7415-034-6.
7. *Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications*. **Kesh, Sherif MAS.** 2, Saudi-arabia : Bioprocessing & Biotechniques, 2014, Vol. 4. ISSN 2155-9821.
8. **Steinbüchel, Alexander.** (2005) *Biotechnology of Biopolymers. From synthesis to Patents*. Weinheim : Wiley-VCH. ISBN 3-527-31110-6.
9. **Cruz, Cristian Grande.** (2014) *Desarrollo de nanocompuestos basados en celulosa bacteriana para aplicaciones biomédicas*. Valencia : s.n..
10. *Nanocellulose Patents Trends: A Comprehensive Review on Patents on Cellulose Nanocrystals, Microfibrillated and Bacterial Cellulose*. **Charreau, Hernán, Foresti, María L. y Vázquez, Analía.** 1, Buenos Aires : Recent patents on nanotechnology, 2013, Vol. 7.
11. **Faerzah Esa, Siti Masrinda Tasirin, Norliza Abd Rahman.** (2014) *Overview of Bacterial Cellulose Production and Application*. Selangor, Malaysia : Procedia, Vol. 2. ISSN 2210-7843.
12. **Chávez-Pacheco, Juan Luis.** (2004) *Celulosa bacteriana en Gluconacetobacter Xylinum: Biosíntesis y aplicaciones*. 1, México DF : UNAM, Vol. 7. ISSN 1405-888X.
13. **Rodríguez, Francisco Castillo.** (2005) *Celulosa y Ligninas: Degradación de la celulosa*. [aut. libro] Rafael Blasco, María José Huertas María Dolores Roldán. *Biotecnología Ambiental*. Madrid : Tébar.
14. **al, H.S. Barud et.** (2015) *Transparent composites prepared from bacterial cellulose and castor oil based polyurethane as substrates for flexible OLEDs*. 44, San Paulo : Journal of Materials Chemistry C, Vol. 3. ISSN 2050-7526.
15. **Gama, Miguel, Gatenholm, Paul y Klemm, Dieter.** (2012) *Bacterial NanoCellulose: A sophisticated multifunctional material*. Boca Raton, FL : CRC Press, 2013. ISBN: 978-1-4398-6991-8.
16. **J, Shah y Jr., Brown RM.** (2005) *Towards electronic paper displays made from microbial cellulose*. 4, Austin : Springer-Verlag, Vol. 66.
17. **Pérez, D.** La nanocelulosa desafía al grafeno como nuevo material 'milagroso'. *El Confidencial*. [En línea] 11 de Abril de 2013. [Citado el: 27 de Febrero de 2016.] [http://www.elconfidencial.com/tecnologia/2013-04-11/la-nanocelulosa-desafia-al-grafeno-como-nuevo-material-milagroso\\_767408/](http://www.elconfidencial.com/tecnologia/2013-04-11/la-nanocelulosa-desafia-al-grafeno-como-nuevo-material-milagroso_767408/).

18. **Chawla, Prashant R., y otros.** (2008) *Microbial Cellulose : Fermentative production and applications.* 2, Mumbai : Food Technol. Biotechnol, Vol. 47. ISSN 1330-9862.
19. **Brown, R. M., Jr., Saxena, I.M** (2000) *Cellulose biosynthesis: a model for understanding the assembly of biopolymers.* s.l. : Plant Physiol. Biochem., Vol. 38.
20. **Peña, Antonio y Ángel Arroyo, Armando Gómez, Ricardo Tapia.** (2004) *Bioquímica.* Ciudad de México : Limusa. ISBN 968-18-2660-4.
21. **Koyama, M, y otros.** (1997) *Parallel-up structure evidence the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose.* USA : Proc. Natl. Academy. Vol. 94.
22. **Tahara, N, y otros.** (1997) *Degree of polymerization of cellulose of A. xylinum.* s.l. : Bioscience Biotechnology and Biochemistry, Vol. 61.
23. **Frankenfeld, Katrin** (2013) *Composites based on bacterial cellulose: Potential for technical processes ..* Bad Langensalza : Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie.
24. **GmbH, fzmb.** Nanomasque. [En línea] 2015. [Citado el: 7 de Marzo de 2016.] <http://www.nanomasque.de/seiten/englisch/product.html>.
25. **Masaru Ishihara, Shigeru Yamanaka.** (2003) *Modified bacterial cellulose.* US6627419 B2 US. Concesión.
26. . **Luis Alfonso Caicedo, F.P. De França, L. López** (2001). *Factores para el escalado del proceso de producción de celulosa bacteriana en cultivo estático.* s.l. : Revista Colombiana de Química, Vol. 30.
27. **Garima Mathur, Aarushi Dua, Anushuya Raj Das, Harleen Kaur, Samiksha Kukal, Parul Sharma, Navendu Goswami, Anshuman Sahai,.** (2015) *Bacteria Cellulose: Biopolymer from Gluconacetobacter Xylinus.* 1, India : Macromolecular Symposia, Vol. 347. doi: 10.1002/masy.201400041.
28. **Faustino, Angela, y otros.** (2014) *Bacterial Cellulose production by G. xylinus by employing alternative culture media.* Heidelberg: Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 99.
29. **Masanobu Matsuoka, Takayasu Tsuchida, Kazunobu Matsushita, Osao Adachi & Fumihiro Yoshinaga.** (2014) *A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by Acetobacter xylinum subsp. sucrofermentans.* 4, s.l.: Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, Vol. 60. ISSN: 0916-8451.
30. **S. O. Bae, M. Shoda.** (2005) *Production of bacterial cellulose by Acetobacter xylinum BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor.* Yokohama : Applied Microbiology Biotechnology, Vol. 67. DOI 10.1007/s00253-004-1723-2.
31. . **L. L. Zhou, D. P. Sun, L. Y. Hu, Y. W. Li , J. Z. Yang.** (2007) *Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by Acetobacter xylinums.l.* : J Ind Microbiol Biotechnol, Vol. 34. DOI 10.1007/s10295-007-0218-4.
32. **Kongruang, Sasithorn** (2007) *Bacterial Cellulose Production by Acetobacter xylinum Strains from Agricultural Waste Products..* Bangkok: Appl Biochem Biotechnol, Vol. 148. DOI 10.1007/s12010-007-8119-6.
33. **Krystynowicz A, Czaja W, Wiktorowska-Jezierska A, Goncalves-Mis'kiewicz M, Turkiewicz M and Bielecki S.** (2002) *Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose..* Lodz, Polony : Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, Vol. 29. ISBN 1367-5435/02.

34. **Cheng, Kuan-Chen y Catchmark, Jeff M and Demirci, Ali.** (2009) *Enhanced production of bacterial cellulose by using a biofilm reactor and its material property analysis*. Pennsylvania : Journal of Biological Engineering, Vol. 3. doi:10.1186/1754-1611-3-12.
35. **Zahan, Khairul Azly , Pa'e, Norhayati y Muhamad, Ida Idayu.** (2014) *Process Parameters for Fermentation in a Rotary Disc Reactor for Optimum Microbial Cellulose Production*, Malaysia : BioResources, Vol. 9.
36. **Kralisch, Dana, y otros** (2010) *White Biotechnology for Cellulose Manufacturing—The HoLiR Concept.* 5, Rudolstadt, Germany : Biotechnol. Bioeng, 2010, Vol. 105. doi:10.1002/bit.22579.
37. **Miguel Gama, Paul Gatenholm, Dieter Klemm.** (2014) *Bacterial NanoCellulose: A sophisticated Multifunctional Material*. Boca Raton, FL : CRC Press, 2014. 978-1-4398-6992-5.
38. **Hyo-Jeong Song, Hongxian Li, Jin-Ho Seo, Myong-Jun Kim, Seong-Jun Kim.** (2009) *Pilot-scale production of bacterial cellulose by a spherical type bubble column bioreactor using saccharified food wastes*. Korea : Korean Journal of Chemical Engineering, Vol. 26. ISSN: 0256-1115.
39. **Bank Indonesia.** Industria de Nata de Coco. *Bank Indonesia*. [En línea] [Citado el: 13 de Junio de 2016.] <http://www.bi.go.id/id/umkm/kelayakan/pola-pembiayaan/industri/Documents/351c6891b09f45cf8cd29c88480ed508IndustriPengolahanNatadeCoco.pdf>.
40. **Al-Mashhadani, Mahood, Wilkinson, Stephen y Zimmerman, William.** (2015) *Airlift bioreactor for biological applications with microbubble mediated transport processes*. Baghdad : Crossmark, Chemical Engineering Science, Vol. 137, págs. 243-253. ISSN: 0009-2509.
41. **Merchuck, Jose C. y Garcia, Francisco.** (2010) Bioreactors, Airlift reactor. [aut. libro] Michael C. Flickinger. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. s.l.: Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, pág. 320.
42. **T. Jones, Samuel.** (2007) *Gas-liquid mass transfer in a airlift loop reactor for syngas fermentation*. Ames : ProQuest, 2007. págs. 16-189.
43. **Moses, Vivian y E. Cape, Richard.** (1999) *Biotechnology : The science and the business*. [ed.] Derek G. Springhman. London : OPA. ISSN: 90-5702-407-1.
44. **Laboreur, Pierre.** (1988) *PROCESS FOR PRODUCING BACTERIAL CELLULOSE FROM MATERIAL OF PLANT ORIGIN* . WO1988009381 A1 Francia, 12 de Diciembre. Aplicación.
45. **Science, BioReactor.** AirLift BioReactor Systems. *BioReactor Science*. [En línea] [Citado el: 22 de Julio de 2016.] <http://www.bioreactorsciences.com/air-lift-bioreactor-system.html>.
46. **Upadhyay, Atul, Prava Lama, Jeewan y Tawata, Shinkichi.** (2009) *Utilization of Pineapple Waste: A review*. 10, Okinawa, Japan : Journal of Science and Technology Nepal, Vol. 6. ISSN 1816-0727 .
47. **G.C. Avendaño - Romero, A. López - Malo y E. Palou.** (2013) *Propiedades del Alginato y aplicaciones en alimentos*. Ingeniería Química, Universidad de las Américas, Puebla, México : Temas selectos de Ingeniería de Alimentos.



48. **The American Society of Mechanical Engineers.** (2009) *ASME B31.3 Process Piping Guide*.
49. **SPEARS.** Válvulas de compuertas. [En línea] SPEARS, 2010. [Citado el: 5 de Mayo de 2016.] [http://new.zigma.cl/wp-content/uploads/2014/09/021\\_Gate-V\\_SP.pdf](http://new.zigma.cl/wp-content/uploads/2014/09/021_Gate-V_SP.pdf).
50. **Limited, Bluestone.** Vertical Autoclave VA-FJ Pressure Steam Sterilizer for Sale - Bluestone Autoclave. [En línea] [Citado el: 4 de Julio de 2016.] <http://www.bluestoneautoclave.com/vertical-autoclave-va-fj-pressure-steam-sterilizer-for-sale-bluestone-autoclave.html#!prettyPhoto>.
51. **Smith, L.O., Cristol, S.J y Allinger.** *Química Orgánica*. Barcelona : Reverté, 1978. ISBN 84-291-7015-4.
52. **Rivera, María Elena Tovar de.** *Diseño de Plantas de Proceso - Estimación de los costos de inversión en Plantas Químicas*. Oruro : Universidad de Oruro. <http://docentes.uto.edu.bo/mtovarm/wp-content/uploads/CAPIII-ESTCOS297.pdf>
53. **Sinnott, R. K.** (1983) Costing and project evaluation. [aut. libro] J.M. Coulson y J.F. Richardson. *Chemical Engineering*. Corporate Drive : Elsevier, Vol. 6.
54. *Comparative Scale-Up and Cost Estimation of a Biological Trickling Filter and a Three-Phase Airlift Bioreactor for the Removal of Methylene Chloride from Polluted Air.* **Zuber, Laurent , Dunn, Irving J. y Deshusses, Marc A.** (1997) Zurich : Journal of the Air & Waste Management Association, Vol. 47. 47:969-975.
55. **Mundi, Index.** Wood Pulp. *Index Mundi*. [En línea] Julio de 2016. [Citado el: 9 de Agosto de 2016.] <http://www.indexmundi.com/commodities/?commodity=wood-pulp&months=180&currency=eur>.
56. **PH-101, Avicel®.** Avicel. *Sigma Aldrich*. [En línea] 2016. [Citado el: 9 de Agosto de 2016.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/11363?lang=es&region=ES>.
57. **Cellulose.** Sigma Aldrich. [En línea] 2016. [Citado el: 9 de Agosto de 2016.] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/cellulose12345900434611?lang=es&region=ES>.
58. *Las emisiones de CO2 bajaron un 2,1 % en España en 2014.* **Agencia EFE.** [En línea] 15 de Junio de 2015. [Citado el: 9 de Agosto de 2016.] <http://www.efe.com/efe/espana/portada/las-emisiones-de-co2-bajaron-un-2-1-en-espana-2014/10010-2639644>.
59. **Bosques. WWF. WWF.** [En línea] 2015. [Citado el: 8 de Agosto de 2016.] [http://www.wwf.es/que\\_hacemos/bosques/](http://www.wwf.es/que_hacemos/bosques/).
60. *El estado de los bosques del mundo 2012.* **Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.** Roma : FAO, 2012. 978-92-5-307292-7